



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**Departamento de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**EFEITOS DO P-CIMENO E DO ALFA-PINENO SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA AGUDA**

**RAQUEL KUMMER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman

MARINGÁ, 2015  
**RAQUEL KUMMER**

**EFEITOS DO P-CIMENO E DO ALFA-PINENO SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman

MARINGÁ, 2015  
**RAQUEL KUMMER**

**EFEITOS DO P-CIMENO E DO ALFA-PINENO SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado(a) em: / / 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>o</sup>. Dr.: Roberto Kenji Nakamura Cuman  
Instituição: Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup>. Dra.:  
Instituição:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra.:  
Instituição:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra.:  
Instituição:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra.:  
Instituição:

---

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação, Bloco K 68, Sala 106, na Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá - Paraná - BR.**

**Parte deste trabalho foi apresentado no 42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, IV Seminário Anual do Programa de Ciências Farmacêuticas, V Seminário Anual do Programa de Ciências Farmacêuticas e no International Symposium on Essential Oils**

**e**

**Parte deste trabalho foi publicado na International Journal of Applied Research in Natural Products: Kummer R, Estevão-Silva CF, Bastos RL, Silva-Comar FMDS, Spironello RA, Rocha BA, Amado CAB, Cuman RKN. Effect of p-cymene on chemotaxis, phagocytosis and leukocyte behaviors. International Journal of Applied Research in Natural Products, v. 8, p. 20-27, 2015.**

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Libânia e Jair, ao meu esposo Gleison  
e a meus irmãos pelo apoio  
em todas as minhas conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades, que me protege, abençoa e encaminha minha vida.

Aos meus queridos pais, Libânia e Jair, e a meus irmãos, Tomé e Davi, pelo carinho, amor e incentivo. Amo vocês!

Ao meu esposo Gleison, pela compreensão, auxílio, amor e por estar ao meu lado em todos os momentos. Te amo!

Aos meus queridos amigos, Camila e Alex, que me acolheram como um membro da família e foram essências para esta conquista. Muito obrigada por tudo, foram muitas emoções divididas ao longo desses anos. Vocês são especiais! Sentirei muita saudade!

A Sara e ao Bruno, amigos queridos, sempre dispostos a ajudar e a dar boas risadas. Sentirei muita saudade!

Ao Rafael Lucena Bastos, pelo auxílio prestado na execução dos experimentos.

Ao meu orientador, Roberto Cuman, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, apoio, paciência, incentivo, amizade e aos momentos de descontração. Obrigada por tudo!

Aos demais professores e colegas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia da Inflamação, Célia e Jaílson, que sempre me auxiliaram com carinho e paciência. Muito obrigada!

**KUMMER, R 2015. Efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno sobre a resposta inflamatória aguda, Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 59p.**

## **RESUMO**

A inflamação é a primeira defesa do organismo humano frente a uma lesão tecidual. As plantas são fontes importantes de substâncias bioativas, e parte de suas atividades biológicas são atribuídas aos óleos essenciais. Os monoterpenos representam os principais constituintes dos óleos essenciais e possuem muitos efeitos biológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos anti-inflamatórios dos monoterpenos p-cimeno e alfa-pineno. Para isso, avaliou-se a citotoxicidade pelo ensaio de MTT, a toxicidade aguda em modelo animal, a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, a migração celular *in vivo* através da peritonite e da microcirculação mesentérica induzidas por carragenina. O p-cimeno também foi avaliado frente a capacidade fagocítica de macrófagos e sobre os níveis de citocinas. Nossos resultados demonstraram que o p-cimeno e o alfa-pineno apresentaram baixa citotoxicidade até a dose de 90µg/mL e ausência de toxicidade aguda até 3g/Kg. O p-cimeno (3, 10, 30 e 60 µg/ml) inibiu a quimiotaxia de neutrófilos frente ao fMLP; reduziu a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares para a cavidade peritoneal (100, 200 e 400 mg/Kg); reduziu o número de leucócitos *rolling* (100 e 200 mg/Kg); o número de leucócitos aderentes (100, 200 e 400 mg/Kg); estimulou a capacidade fagocítica de macrófagos (3, 10 e 30 µg/ml) e inibiu a secreção de TNF-α (10 e 90 µg/ml). O alfa-pineno (1, 3, 10 e 30 µg/ml) inibiu a quimiotaxia de neutrófilos frente ao fMLP e ao LTB<sub>4</sub>; reduziu a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares para a cavidade peritoneal (200 e 400mg/Kg) e diminuiu o número de leucócitos *rolling* e aderentes (200 e 400 mg/Kg). Nossos resultados mostraram evidências de que os monoterpenos p-cimeno e alfa-pineno possuem efeitos anti-inflamatórios, e podem ser considerados drogas promissoras no tratamento de doenças inflamatórias que apresentam uma migração excessiva de leucócitos. Todavia, mais estudos serão necessários para elucidar o mecanismo de ação destes compostos.

**Palavras-chave:** p-cimeno, alfa-pineno, quimiotaxia, migração de leucócitos, microcirculação *in vivo*.

**KUMMER, R 2015. Effects of p-cymene and alpha-pinene on acute inflammatory response, Ph.D. Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 59p.**

#### **ABSTRACT**

Inflammation is the first defense of the human organism against tissue injuries. Plants are important sources of bioactive substances and part of its biological activities are attributed to the essential oils. The monoterpenes are the main constituents of the essential oils and have many biological effects. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of p-cymene and alpha-pinene, plant-derived monoterpene. Therefore, it was evaluated the cytotoxicity by MTT test, acute toxicity in animal models, *in vitro* neutrophil chemotaxis, *in vivo* cell migration by peritonitis and mesenteric microcirculation carrageenan-induced. The effects of p-cymene was also evaluated on the phagocytosis ability of the macrophages and cytokine levels. In the cell viability assay, p-cymene and alpha-pinene showed low cytotoxicity (until 90 µg/mL) and absence of acute toxicity at doses up to 3g/Kg. The p-cymene (3, 10, 30, 60 µg/mL) reduced neutrophil migration toward fMLP; decreased the infiltration of total and polymorphonuclear leukocytes into peritoneal cavity (100, 200 and 400 mg/Kg); decreased the number of *rolling* (100, 200 mg/kg) and adherent leukocytes (100, 200, 400 mg/kg) to the perivascular tissue; increased the macrophage phagocytic index and reduced TNF-α levels. The alpha-pinene (1, 3, 10, 30 µg/ml) reduced neutrophil migration toward fMLP and LTB4 stimulation; decreased the infiltration of total and polymorphonuclear leukocytes into peritoneal cavity (200 and 400 mg/Kg) and decreased the number of *rolling* and adherent leukocytes (200 and 400 mg/Kg) to the perivascular tissue. Our results showed evidences that p-cymene and alpha-pinene have anti-inflammatory effects and may be considered as promising drugs for treatment of inflammatory process with excessive leukocyte migration; however, more studies are needed to elucidate the mechanism action of these monoterpenes.

**Keywords:** p-cymene, alpha-pinene, chemotaxis, leukocytes migration, *in vivo* microcirculation.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Recrutamento de leucócitos no processo inflamatório
- FIGURA 2** Estrutura química do p-cimeno (A) e do alfa-pineno (B)
- FIGURA 3** Modelo de Câmara de Boyden
- FIGURA 4** Efeito inibitório do p-cimeno na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*
- FIGURA 5** Efeito do tratamento com p-cimeno sobre a migração de leucócitos totais (LT) e polimorfonucleares (PMN) para a cavidade peritoneal
- FIGURA 6** Efeito do tratamento com p-cimeno sobre os leucócitos *rolling* (A) e aderentes (B) induzidos por carragenina
- FIGURA 7** Efeito do p-cimeno sobre a atividade fagocítica de macrófagos
- FIGURA 8** Efeito do p-cimeno sobre os níveis de TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) em neutrófilos estimulados com fMLP
- FIGURA 9** Efeito inibitório do alfa-pineno na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*
- FIGURA 10** Efeito do tratamento com alfa-pineno sobre a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares (PMN) para a cavidade peritoneal
- FIGURA 11** Efeito do pré-tratamento com alfa-pineno sobre os leucócitos *rolling* (A) e aderentes (B) induzidos por carragenina

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BLT1</b>	Receptor do Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>DL50</b>	Dose letal mediana
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>fMLP</b>	Formil metionil leucil fenilalanina
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados à proteína G
<b>ICAM</b>	Moléculas de adesão intercelular
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>LFA-1</b>	Antígeno-1 Associado à Função Linfocitária
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>MTT</b>	Brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>PAF</b>	Fator de ativação plaquetária
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento - $\beta$
<b>TLR</b>	Receptor Toll-like
<b>TLR4</b>	Receptor Toll-like 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>VCAM-1</b>	Moléculas de adesão vascular

## **ANEXOS**

ANEXO A - Effect of p-cymene on chemotaxis, phagocytosis and leukocyte behaviors

ANEXO B - Alpha-pinene reduces *in vitro* and *in vivo* leukocyte migration during acute inflammation

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	12
1.2 MIGRAÇÃO CELULAR.....	13
1.3 PLANTAS MEDICINAIS E OS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	14
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>17</b>
<b>3 EFEITOS DO P-CIMENO SOBRE A QUIMIOTAXIA, A FAGOCITOSE E O COMPORTAMENTO DE LEUCÓCITOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.2 RESULTADOS.....	23
3.3 DISCUSSÃO.....	29
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	33
<b>4 ALFA-PINENO REDUZ A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DURANTE A INFLAMAÇÃO AGUDA.....</b>	<b>34</b>
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
4.2 RESULTADOS.....	38
4.3 DISCUSSÃO.....	44
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A primeira defesa do organismo humano frente a um dano tecidual é a resposta inflamatória (1). Diferentes estímulos podem desencadear uma resposta inflamatória, tais como, infecções, traumas e mecanismos imunológicos (2). A inflamação é um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, que são produzidas por células ou derivadas de proteínas plasmáticas, conjuntamente denominados de mediadores inflamatórios ou mediadores químicos (3,4).

A resposta inflamatória pode ser classificada em aguda ou crônica. A fase aguda da inflamação é coordenada pelo sistema imune inato, e é caracterizada por um início abrupto e de curta duração. Nesta fase ocorrem alterações vasculares que levam ao extravasamento do líquido vascular e das proteínas plasmáticas, além da migração de leucócitos, principalmente os polimorfonucleares, como os neutrófilos (1,4). As manifestações clínicas decorrentes destas alterações são chamadas de sinais cardinais, e incluem o rubor, o calor, o edema, a dor e o prejuízo funcional (5). Quando a inflamação é solucionada, ocorre a remoção do agente irritante e o reparo do tecido lesado (6), no entanto, diversas condições patológicas são sustentadas por uma inflamação não resolutive, que pode progredir para uma fase crônica (4).

A fase crônica pode desenvolver-se após uma inflamação aguda ou então iniciar insidiosamente. Esta inflamação tem uma duração prolongada, podendo chegar a semanas, meses, e em alguns casos, anos (7). A resposta crônica é caracterizada pela infiltração de células mononucleares, especialmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos, e além das manifestações clássicas da inflamação, pode resultar em substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo fibroso e angiogênese (8,9). O processo crônico é conhecido por desempenhar um papel importante na fisiopatologia de inúmeras doenças, que podem desencadear a dor crônica e a incapacidade, como por exemplo, na artrite reumatóide, no câncer e no lúpus eritematoso sistêmico (10).

Tanto as inflamações agudas quanto as inflamações crônicas são reguladas por mediadores inflamatórios, ou de origem tecidual ou de origem plasmática. Estes mediadores são produzidos e ativados em resposta aos estímulos inflamatórios (5). Sumariamente, estas moléculas induzem a vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular, além atuarem em células residentes (fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e mastócitos) e nas células inflamatórias recrutadas (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos). Algumas delas, desencadeiam respostas sistêmicas durante a inflamação, como a febre, a hipotensão, a síntese de proteínas de fase aguda e a leucocitose (6,11).

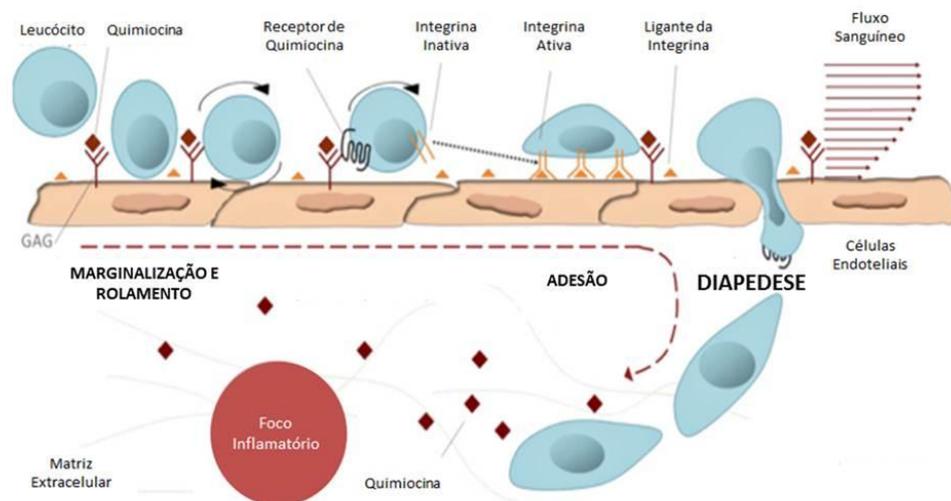
Dentre os mediadores que regulam as respostas inflamatórias encontram-se: os metabólitos inflamatórios lipídicos, como o fator de ativação plaquetária (PAF) e os metabólitos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas); as proteínas do plasma, derivadas do

sistema complemento, da coagulação e das cininas; o óxido nítrico e as citocinas (7). As citocinas são proteínas sintetizadas por vários tipos celulares, que são capazes de modular as funções celulares, sendo moléculas importantes no processo inflamatório. Muitas citocinas são multifuncionais e algumas atuam como mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e outras como anti-inflamatórios (IL-10 e IL-35) (12,13). Assim, as citocinas bem como os demais mediadores químicos são indispensáveis para a regulação do processo inflamatório, e para que uma inflamação não se torne prejudicial às células normais do tecido lesado, é substancial a modulação entre os mediadores pró-inflamatórios e os anti-inflamatórios (5).

## 1.2 MIGRAÇÃO CELULAR

O recrutamento de leucócitos a partir da vasculatura em um tecido inflamado é um processo importante da resposta inflamatória. Este processo é fortemente regulado e composto por múltiplas etapas que, em geral, são semelhantes para as diferentes subpopulações de leucócitos (14).

Na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento dos leucócitos envolvem os seguintes passos: marginalização dos leucócitos, rolamento, adesão, e, finalmente, a transmigração (Figura 1) (15,16). Os neutrófilos são recrutados rapidamente para o foco inflamatório e dominam o influxo inicial de leucócitos (17). O recrutamento dos leucócitos é iniciado por mudanças na superfície do endotélio vascular que resultam da estimulação por mediadores inflamatórios. Uma variedade de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e aminas vasoativas estão envolvidos no recrutamento de leucócitos através da expressão aumentada de moléculas de adesão celular e da quimiotaxia. A histamina e as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) são exemplos de mediadores que são secretados a partir de leucócitos residentes, quando estes entram em contato com os agentes patogênicos (15,18).



**Figura 1.** Recrutamento de leucócitos no processo inflamatório (19)

A baixa tensão de cisalhamento e as colisões com os glóbulos vermelhos levam a marginalização dos leucócitos para a periferia do vaso (16). Na sequência, as fracas interações adesivas, mediadas por selectinas (E e P-selectinas), integrinas ( $\beta 2$  e  $\alpha 4$ -integrinas) e seus ligantes correspondentes são estabelecidas, e este contato facilita o reconhecimento inicial dos quimioatratores, principalmente as quimiocinas (19,20). O rolamento dos leucócitos sobre as células endoteliais é mediado pelas selectinas e seus respectivos ligantes (carboidratos). Esta ligação fornece uma interação fraca entre os leucócitos e endotélio vascular, resultando no rolamento (14,21). As quimiocinas medeiam suas atividades pela ligação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (22). Os GPCRs ativado e também a ligação das selectinas a seus ligantes conduzem a ativação das integrinas, que interagem com as moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, como as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão vascular (VCAM-1), resultando no fenômeno de adesão (20,23). Além das integrinas, as proteínas quimiotáticas de monócitos-1 (MCP-1) e de linfócitos (LFA-1) também auxiliam na adesão dos leucócitos (24,25). Uma vez aderidos ao longo do endotélio vascular, os leucócitos rastejam e migram por aberturas entre as células endoteliais (migração transendotelial) ou através do corpo das células endoteliais (via transcelular) (19,24).

Após a transmigração os leucócitos continuam a migrar em direção ao foco inflamatório, seguindo um gradiente de concentração de substâncias quimiotáticas, em um processo denominado de quimiotaxia (26). Os principais agentes quimiotáticos incluem as quimiocinas (principalmente receptores CXCR2 para neutrófilos), lipídios ( $LTB_4$ , PAF), anafilotoxinas do sistema complemento (C5a e C3a) e o peptídeo formil metionil leucil fenilalanina (fMLP) (23). No local da inflamação os neutrófilos podem eliminar patógenos por mecanismos extracelulares ou intracelulares, que incluem o mecanismo dependente da enzima NADPH-oxidase (produção de espécies reativas de oxigênio - EROs) e proteínas antibacterianas, como as catepsinas, defensinas, lactoferrinas e as lisozimas (15). Deste modo, a duração e intensidade da reação inflamatória devem ser firmemente reguladas, pois a infiltração persistente de leucócitos pode causar danos nos tecidos, e este fenômeno está associado com as doenças inflamatórias crônicas (18). Diversos produtos naturais apresentam atividade inibitória da quimiotaxia de leucócitos *in vivo* e *in vitro*, incluindo os óleos essenciais, como por exemplo, o óleo essencial do gengibre e do alecrim (27,28).

### 1.3 PLANTAS MEDICINAIS E OS ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas representam uma das mais importantes fontes de substâncias com atividades biológicas, e a sua utilização para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade (29). Um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais têm sido observado nos últimos anos, e os pesquisadores visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (30).

As plantas aromáticas são utilizadas desde a antiguidade devido a suas propriedades conservantes, medicinais e também para conferir aroma e sabor aos alimentos. Suas propriedades farmacêuticas são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais (31,32).

Adicionalmente, as plantas medicinais e aromáticas têm sido exploradas para o desenvolvimento de diversos produtos, como, fármacos, perfumes, corantes e inseticidas. Como os consumidores também têm mostrado interesse crescente nestes produtos, técnicas biotecnológicas inovadoras estão sendo desenvolvidas e aplicadas para alterar o metabolismo secundário das plantas, com o intuito de melhorar a qualidade e a quantidade de metabólitos de interesse específico (33). Nos últimos anos com os avanços nos métodos de isolamento, purificação e determinação estrutural houve uma melhor compreensão das composições químicas dos óleos essenciais, incluindo os vestigiais, aqueles que se encontram em baixas quantidades (34).

Os óleos essenciais ou essências são misturas complexas naturais de metabólitos secundários voláteis, eles podem ser obtidos de diversas partes da planta, como das raízes e rizomas, folhas, cascas e ramos, flores, frutos e sementes (35,36). A sua composição pode variar de acordo com a parte da planta utilizada como matéria-prima, além de outros fatores, como o cultivo, o solo, as condições climáticas e a época de colheita. Todas estas variáveis podem determinar a composição e a qualidade do óleo essencial (37). Eles podem ser isolados das plantas por destilação ou por outras técnicas de extração (38).

Os constituintes de óleos essenciais de plantas se encaixam em duas classes químicas completamente distintas, os terpenóides e os fenilpropanóides. Os terpenos representam os componentes principais, que ocorrem com mais frequência e abundância (39). Os principais terpenóides encontrados nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos (32,40). Estudos prévios têm demonstrado a atividade biológica de óleos essenciais de plantas, onde a presença de terpenóides e fenilpropanóides confere atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, imunomoduladora, antiemética, anti-helmíntica, anti-infecciosa, antitumoral, dentre outras (35,41–45).

### **1.3.1 Monoterpenos**

Os monoterpenos são fitoquímicos que pertencem ao grupo químico de terpenos e são os principais constituintes de óleos essenciais (40,46). A maioria dos monoterpenos são lipofílicos e possuem estruturas altamente voláteis. Eles são líquidos, incolores, quimicamente reativos e apresentam aroma característico. Além disso, este grupo com inúmeros compostos possui esqueletos básicos variáveis e exibem estereoisômeros (47).

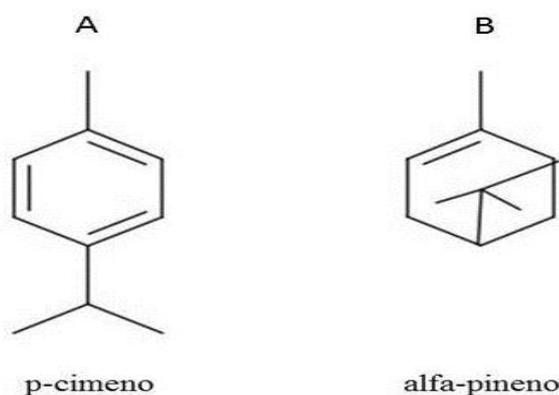
Estudos prévios demonstraram que os monoterpenos possuem uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiarrítmica, anestésica, anti-inflamatória e antinociceptiva (46,48–51). Estas propriedades podem ser potencialmente úteis no tratamento de várias condições patológicas (47).

São vários os monoterpenos que apresentam atividades biológicas, tais como o alfa-pineno (52), o anetol (53), o borneol (54), o 1-8 cineol (55), o p-cimeno (56), o eugenol (57) e o limoneno (58). Considerando que os monoterpenos são comuns em muitas espécies de plantas e são utilizados em preparações cosméticas, farmacêuticas e na indústria alimentar, é importante avaliar o potencial farmacológico destes compostos (50).

O monoterpeno p-cimeno (Figura 2A) é um composto orgânico aromático que é empregado na produção de substâncias químicas e como agente aromatizante (59,60). Este componente pode ser encontrado e isolado nos óleos essenciais de plantas pertencentes às gimnospermas e às angiospermas (61,62). Como grande parte dos monoterpenos obtidos de plantas, algumas atividades biológicas estão associadas ao p-cimeno, tais como: antioxidante (63), anti-inflamatória (64,65), antinociceptiva (49) e antimicrobiana (62,66).

O terpenóide alfa-pineno (Figura 2B), classificado como um monoterpeno bicíclicos, pode ser encontrado no óleo essencial de diversas plantas, como por exemplo, coníferas (pinheiro) (52), gênero *Eucalyptus* (67), *Citrus latifolia* Tanaka (42) e *Bupleurum fruitescens* (68). Estes compostos existem como isômeros ópticos, e os dois pinenos ativos são o alfa-pineno e o beta-pineno. Esta mistura racêmica pode estar presente em alguns óleos essenciais, como no do eucalipto, por exemplo (69). Adicionalmente, o alfa-pineno também pode ser empregado em diferentes processos industriais (52).

Estudos prévios têm atribuído algumas propriedades biológicas ao alfa-pineno, incluindo a atividade antimicrobiana (70), anti-inflamatória (71), antialérgica (67) e antioxidante (36).



**Figura 2.** Estrutura química do p-cimeno (A) e do alfa-pineno (B) (40)

A atividade biológica de óleos essenciais de plantas aromáticas tem sido amplamente estudada, porém, ainda são escassos os trabalhos publicados sobre os monoterpenos isolados dos óleos essenciais, como do p-cimeno e do alfa-pineno, especialmente no que se refere ao comportamento leucocitário, envolvendo o processo de quimiotaxia e fagocitose, bem como o envolvimento dos diferentes mediadores inflamatórios nestes eventos. Portanto, estudos e pesquisas poderão contribuir para a descoberta de novas substâncias ativas e para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-inflamatória.

## 2 OBJETIVO

Este trabalho teve o objetivo geral de estudar e identificar os possíveis efeitos anti-inflamatórios dos monoterpenos p-cimeno e alfa-pineno. De modo específico avaliamos:

- a) a citotoxicidade do p-cimeno e do alfa-pineno;
- b) a toxicidade aguda do p-cimeno e do alfa-pineno;
- c) os efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno sobre a quimiotaxia *in vitro*;
- d) os efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno na peritonite induzida por carragenina;
- e) os efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno sobre a microcirculação *in situ*;
- f) os efeitos do p-cimeno sobre a atividade fagocítica;
- g) os efeitos do p-cimeno sobre os níveis de citocinas;

### 3 EFEITOS DO P-CIMENO SOBRE A QUIMIOTAXIA, A FAGOCITOSE E O COMPORTAMENTO DE LEUCÓCITOS

As plantas são uma das principais fontes de substâncias com atividades biológicas e o seu uso para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade (30). Nos últimos anos tem havido um interesse mundial crescente no estudo científico e também na utilização de produtos naturais, e dentro deste contexto, evidenciou-se o seu papel como base para o desenvolvimento de novos fármacos, devido a sua ampla diversidade estrutural e suas relevantes atividades biológicas (72).

O p-cimeno (p – isopropil tolueno, 1-metil-4-isopropil benzeno ou metilpropil benzeno), um monoterpene monocíclico, é um metabólito que pode ser encontrado em alimentos, ervas aromáticas e nos óleos essenciais de plantas, incluindo o óleo essencial do *Citrus latifolia* Tanaka (42,62,64,73). Além disso, o p-cimeno é um produto importante na indústria farmacêutica, cosmética e para a produção de fungicidas e pesticidas (60).

Pesquisas recentes demonstraram que o composto p-cimeno possui atividades biológicas diversas, tais como: antifúngica, antiviral, antimicrobiana, inseticida, antinociceptiva, anti-inflamatória, além de melhorar os parâmetros bioquímicos de ratos tratados com dieta rica em gordura e apresentar efeito relaxante sobre o músculo liso vascular (40,48,49,54,59,62,66,74–76). Entretanto, são poucos os estudos que relacionam este composto à atividade anti-inflamatória, especialmente no que se refere ao comportamento celular durante este processo, envolvendo a quimiotaxia e a fagocitose. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do p-cimeno sobre o comportamento de leucócitos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

##### 3.1.1 Matéria vegetal e obtenção do constituinte isolado

Os frutos de *Citrus latifolia* Tanaka foram adquiridos na feira do produtor da cidade de Maringá-PR, no mês de maio de 2009. O óleo essencial foi obtido das raspas dos flavedos dos frutos de *Citrus latifolia* Tanaka previamente resfriados em geladeira. As massas dos flavedos foram submetidas à hidrodestilação durante 2 horas, utilizando-se o aparato de Clevenger. O óleo essencial obtido foi separado, seco com sulfato de sódio anidro, e armazenado ao abrigo da luz, a temperatura de 4° C. O constituinte p-cimeno foi isolado a partir do óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka como frações de óleo hidrodestilado, e foi identificado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C, como descrito anteriormente (42).

##### 3.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c (20 - 35 g) e camundongos machos da linhagem C57BL/6J (17 - 20 g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais, foram mantidos em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob ciclo claro-escuro 12/12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEAE/UEM 066/2010).

### 3.1.3 Determinação da atividade citotóxica

Os ensaios biológicos para avaliar a atividade citotóxica *in vitro* foram realizados seguindo o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio; Sigma<sup>®</sup>), que é um teste colorimétrico baseado na redução do MTT por enzimas mitocondriais formando os cristais de formazan de cor violeta. Essa redução só ocorre quando as enzimas mitocondrias são ativas e, portanto, a conversão pode ser diretamente relacionada ao número de células viáveis (77).

Para este ensaio, neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, 4 horas após a injeção intraperitoneal com 1mg/cavidade de Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para a coleta das células, os animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm/10 minutos a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Os neutrófilos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 completo e contados em câmara de Neubauer. Na sequência, os mesmos foram plaqueados na densidade de  $5 \times 10^5$  por poço, em microplaca de 96 poços e expostos aos diferentes concentrações de p-cimeno (3, 10, 30 ou 90  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo período de 1 hora e 30 minutos, com a placa incubada, protegida da luz, a  $37^\circ\text{C}$ , com atmosfera a 5% de  $\text{CO}_2$ . As emulsões de p-cimeno foram preparadas com meio RPMI 1640 e emulsionadas por sonicação. Em seguida, foram adicionados 10 $\mu\text{L}$  de MTT, a placa foi incubada nas mesmas condições descritas acima por 2 horas. Após este período o MTT foi retirado, e foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), a placa foi incubada por 10 minutos e a leitura foi realizada em 540 nm em leitor de microplaca - Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom<sup>®</sup>). A porcentagem da viabilidade celular (PVC) foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Absorbância das células tratadas} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

### 3.1.4 Teste de toxicidade aguda

Estudos de toxicidade foram realizados em camundongos machos da linhagem BALB/c. Os animais (n=5 animais por grupo) foram mantidos em jejum durante a noite e então tratados, oralmente (gavagem), com p-cimeno (1, 2, 3 e 4 g/Kg de peso corporal) ou veículo (0,2% - solução aquosa de Tween 80) para o grupo controle. Após o tratamento os animais foram observados durante 7 dias. Comida e água foram fornecidas durante todo o experimento. Neste período de observação foi

registrado o número de mortes entre os animais de cada grupo e a determinação da DL50 foi realizada de acordo com a literatura (78).

### 3.1.5 Ensaio de quimiotaxia *in vitro*

O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizado em micro câmara de Boyden modificada (79) (48 poços; Neuro Probe, Inc., Cabin John, MD–USA) usando filtro de policarbonato (5 µm, 25x80 mm, 50 Pk, GE Water & Proces Technologies), conforme ilustrado na Figura 3.

Neste ensaio, os neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, 4 horas após a injeção intraperitoneal com 1mg/cavidade de Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para a coleta das células, os animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL PBS, pH 7,4 contendo EDTA. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm/10 minutos a temperatura de 4°C. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e sua viabilidade avaliada pelo teste de exclusão do corante Azul de Tripan. As suspensões consideradas ideais foram aquelas com viabilidade superior a 95% de células íntegras.

Os neutrófilos,  $1 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de albumina sérica bovina - BSA à 0,1%, foram incubados, antes do estímulo quimiotático, com diferentes concentrações do p-cimeno (1, 3, 10, 30 ou 60 µg/mL) por 30 minutos. As emulsões de p-cimeno foram preparadas com meio RPMI 1640 e emulsionadas por sonicação. Como controles, neutrófilos foram incubados apenas com o meio RPMI 1640. Na montagem da câmara de Boyden, inicialmente foi adicionado no compartimento inferior 26 µL de fMLP -  $10^{-6}$ M ou leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub> -  $10^{-8}$ M) e o controle negativo RPMI 1640. A seguir foi colocado sobre o compartimento inferior um filtro de policarbonato e acima deste uma membrana de polietileno, sobre os quais o compartimento superior da câmara foi encaixado. Neste compartimento (superior) foram adicionados 50 µL de cada suspensão de neutrófilos pré-tratados. A câmara foi incubada a 37°C com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> pelo período de 1 hora. Posteriormente, o filtro foi removido, fixado em lâmina e corado [kit Instant - Prov (Newprov<sup>®</sup>)]. Os neutrófilos que migraram através do filtro foram contados, em cinco campos selecionados aleatoriamente, utilizando microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por campo, representativos de três experimentos separados.



**Figura 3.** Modelo de Câmara de Boyden

### 3.1.6 Peritonite induzida por carragenina

O ensaio de peritonite, para avaliar a migração de leucócitos *in vivo*, foi realizado com camundongos machos da linhagem C57BL/6J. Os animais foram previamente tratados, por via oral (gavagem), com p-cimeno (100, 200 ou 400 mg/Kg de peso corporal), indometacina (5 mg/Kg - controle positivo, anti-inflamatório não esteroidal de referência) ou veículo (0,2% - solução aquosa de Tween 80, 0.1mL) como controle. A peritonite foi induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina na concentração 500  $\mu$ g por cavidade ou um volume equivalente de veículo (solução salina), 30 minutos após os respectivos tratamentos. Após 4 horas da injeção de carragenina, os animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de PBS, pH 7,4 contendo EDTA. Em seguida, o lavado peritoneal foi coletado, centrifugado a 1000 rpm/10 minutos e o sedimento foi utilizado para a contagem total e diferencial de leucócitos. Os resultados foram expressos como número de leucócitos por cavidade.

### 3.1.7 Migração de leucócitos *in vivo*

Os processos de *rolling* e adesão endotelial de leucócitos foram utilizados como parâmetros para avaliar a migração de leucócitos. Para isso, o tecido mesentérico de camundongos machos da linhagem C57BL/6J foi exposto para o exame microscópico *in situ*.

Previamente, os diferentes grupos de animais foram tratados, por via oral, com p-cimeno (100, 200 ou 400 mg/Kg de peso corporal), indometacina (5 mg/Kg - controle positivo, anti-inflamatório não esteroidal de referência) celecoxibe (5 mg/Kg - controle positivo, anti-inflamatório não esteroidal de referência) ou veículo (0,2% - solução aquosa de Tween 80). A suspensão de carragenina (500  $\mu$ g/cavidade) foi injetada intraperitonealmente, 1 hora após os respectivos tratamentos. Após um período de 2 horas, os animais foram anestesiados (cetamina/xilazina 1:1). Iniciou-se então o procedimento para a exposição do tecido mesentérico, que se deu através de uma incisão longitudinal da pele e do músculo abdominal do lado direito do corpo dos animais. Durante o ensaio os animais foram mantidos em uma placa especial com plataforma transparente onde o tecido mesentérico foi

fixado. Esta placa foi mantida à 37° C e a preparação mantida úmida e quente, com solução de Ringer-Locke com gelatina a 1% (pH 7,2-7,4).

Os vasos selecionados para o estudo foram as vênulas pós-capilares com diâmetro de 18-25 µm. O número de leucócitos com comportamento *rolling* e aderidos ao endotélio foi determinado em intervalos de 5 minutos. Como leucócitos aderentes considerou-se apenas os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio venular por mais de 30 segundos. As células foram contadas na imagem gravada com três campos diferentes para cada animal, para evitar a variabilidade devida à amostragem, e o valor médio foi calculado.

### **3.1.8 Atividade fagocítica de macrófagos**

A atividade fagocítica foi determinada em macrófagos residuais do lavado coletado da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c.

Inicialmente, 5 mL de PBS foram injetados no peritônio dos animais eutanasiados e, na sequência, o lavado peritoneal foi coletado e centrifugado a 1500 rpm/10 min. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de RPMI 1640 e o volume celular corrigido para  $2,5 \times 10^6$  leucócitos/mL. Essa suspensão foi colocada numa placa de 24 poços e incubada por 1 hora a 37°C com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células não aderentes foram removidas por lavagem e as células aderidas corresponderam aos macrófagos residuais. A viabilidade celular foi determinada com azul de Tripán e foi superior a 90% em todos os experimentos. Os macrófagos (aderidos) foram então incubados com p-cimeno (3, 10 ou 30 µg/mL) em meio RPMI 1640 completo por 24 horas a 37°C com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Lipopolissacarídeo (LPS- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 20 µg/mL foi utilizado como controle positivo, e o meio RPMI 1640 como controle negativo. Após a incubação, o sobrenadante foi removido. Células vermelhas do sangue de galinha, a 3% em RPMI, foram adicionadas aos poços contendo os macrófagos aderidos e novamente a placa foi incubada por 1 hora. Ao final, as lamínulas contendo os macrófagos foram coradas [kit Panótico Rápido LB (Laborclin®)] e fixadas em lâminas para contagem celular. O índice de fagocitose (IP) foi medido pela contagem do número de hemácias de galinha fagocitados por 100 macrófagos.

### **3.1.9 Quantificação dos níveis de citocinas**

Para quantificar os níveis de TNF-α e IL-10, os neutrófilos foram isolados de camundongos BALB/c, 6 horas após a injeção intraperitoneal com 1mg/cavidade de Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após a coleta através da lavagem peritoneal, o número de células foi ajustado ( $5 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 completo) e então os neutrófilos foram plaqueados, em microplaca de 96 poços, onde foram expostas aos diferentes tratamentos de p-cimeno (10 ou 90 µg/mL) ou ao meio RPMI 1640 (controle) por 30 minutos, com a placa incubada, a 37°C com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os neutrófilos foram estimulados com adição do agente quimiotático (fMLP – 0,1 µM) em todos os poços, exceto no controle negativo, e a microplaca foi

incubada novamente durante 1 hora, a 37°C com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Na sequência, a microplaca foi centrifugada e o sobrenadante foi removido e rapidamente congelado a -70°C para análise posterior. Os níveis de citocinas foram determinados por meio da técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (R & D system®). Os níveis de citocinas foram expressos em pg/mL.

### **3.1.10 Análise estatística**

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) para cada grupo. A comparação estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. P<0.05 foi considerado como nível de significância.

## **3.2 RESULTADOS**

### **3.2.1 Efeito do p-cimeno sobre a citotoxicidade de neutrófilos**

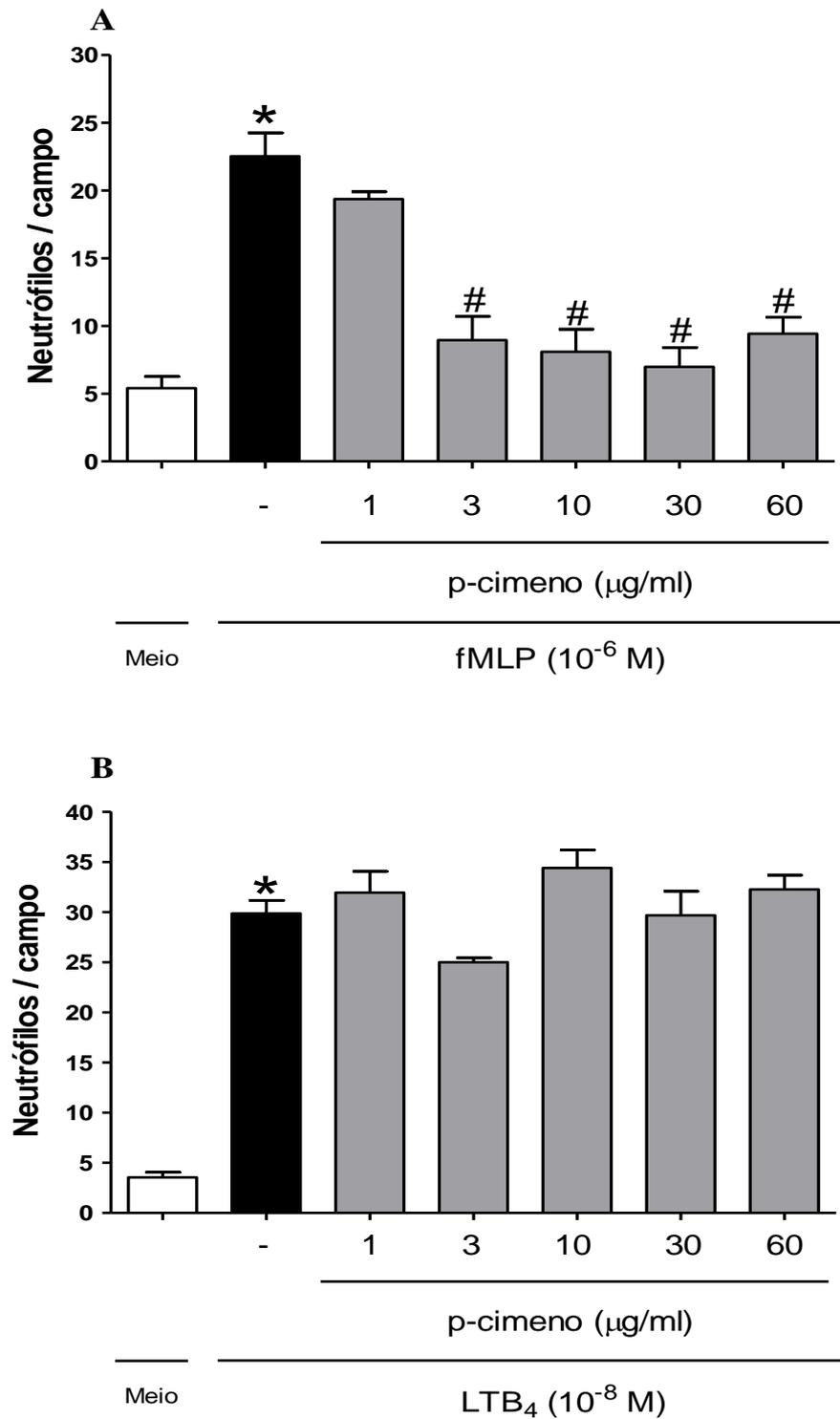
Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c previamente estimulados com Zymosan e a citotoxicidade foi avaliada frente às diferentes concentrações de p-cimeno, conforme descrito na seção de materiais e métodos. O p-cimeno nas concentrações de 3, 10, 30 e 90 µg/mL mostrou uma viabilidade celular de 93%, 89%, 85% e 82%, respectivamente.

### **3.2.2 Efeito do p-cimeno sobre a toxicidade aguda**

Camundongos machos BALB/c foram oralmente tratados, uma única vez, com p-cimeno nas doses de 1, 2 e 3 g/Kg e observados durante 7 dias. A toxicidade aguda do p-cimeno foi baixa, pois durante este período nenhuma morte ou sinais de toxicidade foram evidenciados, impossibilitando a realização do cálculo de DL50 para esta via.

### **3.2.4 Efeito do p-cimeno sobre a quimiotaxia *in vitro***

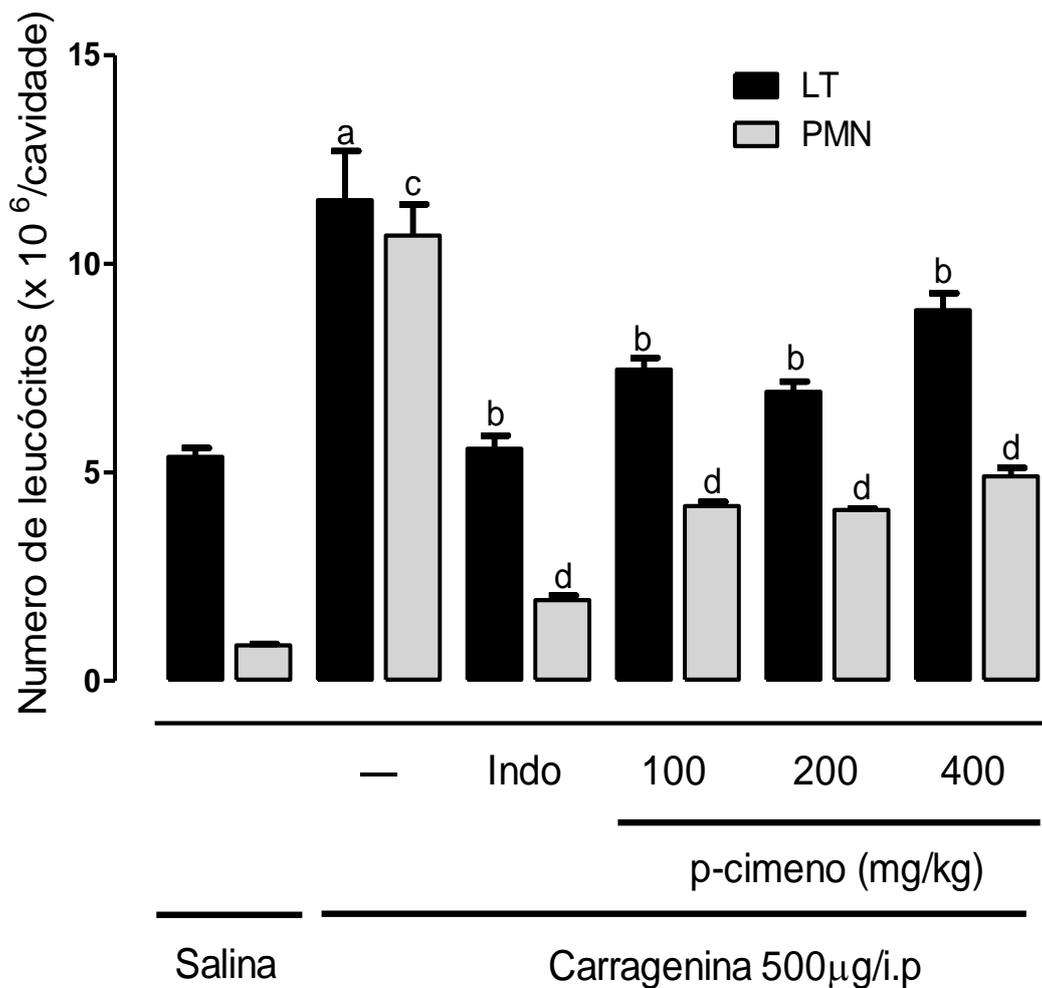
O efeito das diferentes concentrações de p-cimeno sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, está apresentado na Figura 4. O p-cimeno nas concentrações de 3, 10, 30 e 60 µg/mL causou uma inibição significativa da migração de neutrófilos estimulada pelo agente quimiotático fMLP. A porcentagem de inibição para cada concentração de p-cimeno foi de 60.2%; 64.1%; 69.1%; 58.1%, respectivamente. Por outro lado, o composto p-cimeno testado nas mesmas concentrações não inibiu significativamente a migração de neutrófilos estimulada pelo agente quimiotático LTB<sub>4</sub>.



**Figura 4. Efeito inibitório do p-cimeno na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.** Os neutrófilos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos após indução de peritonite com zymosan (1 mg/cavidade). A quimiotaxia dos neutrófilos foi estimulada com fMLP ( $10^{-6}$ M) (A) ou LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$ M) (B) após 30 minutos de incubação com p-cimeno nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 60 µg/mL. O procedimento de quimiotaxia foi realizado em câmara de Boyden conforme descrito na seção 3.1.5. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n = 5) e foram representativos para 3 experimentos independentes. \*p < 0.05 comparado com meio (RPMI 1640). #p < 0.05 comparado com o grupo de neutrófilos estimulados com fMLP ou LTB<sub>4</sub> (One way - ANOVA, teste de Tukey).

### 3.2.5 Efeito do tratamento com p-cimeno sobre a migração celular no exsudato peritoneal de camundongos

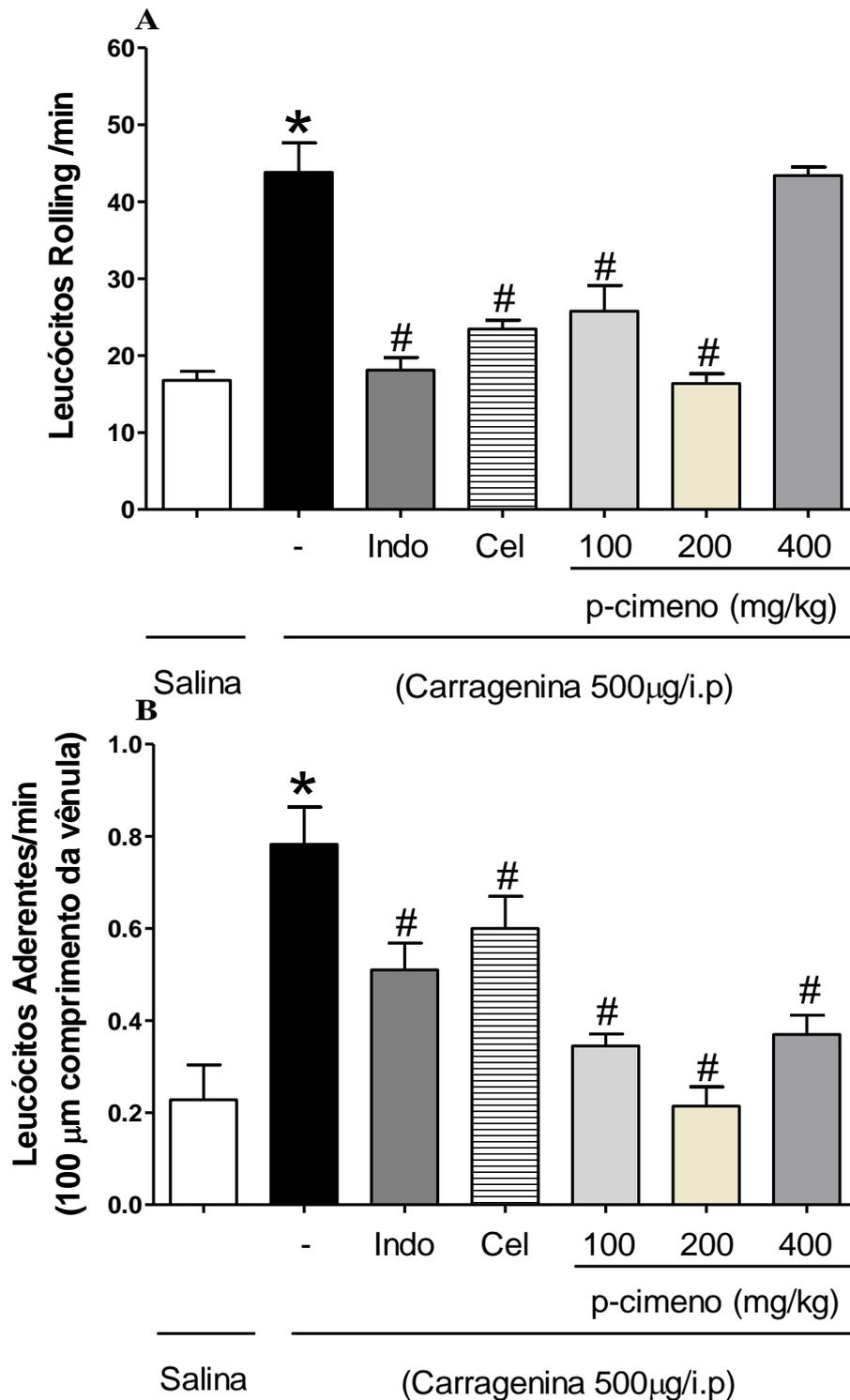
A Figura 5 mostra o número de leucócitos totais e polimorfonucleares que migraram para a cavidade peritoneal de camundongos tratados e não tratados com p-cimeno. Após 4 horas da indução da peritonite com carragenina, observou-se uma resposta inflamatória caracterizada por um aumento no número de leucócitos na cavidade peritoneal ( $11.53 \pm 1.18 \times 10^6$  células/cavidade) quando comparados com o grupo controle (veículo) ( $5.37 \pm 0.20 \times 10^6$  células/cavidade). O tratamento dos animais com p-cimeno nas doses 100, 200 e 400mg/Kg reduziu significativamente a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal (35.2%; 39.8% e 22.9%, respectivamente), ao mesmo tempo em que a infiltração de polimorfonucleares também foi reduzida. A indometacina, fármaco anti-inflamatório de referência, também inibiu significativamente o número de células migratórias, tanto os leucócitos totais quanto os polimorfonucleares.



**Figura 5. Efeito do tratamento com p-cimeno sobre a migração de leucócitos totais (LT) e polimorfonucleares (PMN) para a cavidade peritoneal.** Camundongos C57BL/6 foram tratados por via oral com p-cimeno (100, 200 ou 400 mg/Kg), indometacina (5 mg/Kg) ou veículo e, após 30 minutos, foi induzida a peritonite com carragenina (500µg/camundongo, i.p.). O número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal 4 horas após a injeção de carragenina foi determinada conforme descrito na seção 3.1.6. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM (n = 5). <sup>a</sup> $p < 0.05$  comparado com salina (controle negativo). <sup>b</sup> $p < 0.05$  comparado com o grupo que recebeu carragenina (controle positivo). <sup>c</sup> $p < 0.05$  comparado com salina (controle negativo). <sup>d</sup> $p < 0.05$  comparado com o grupo que recebeu carragenina (controle positivo) (One-way ANOVA, teste de Tukey).

### 3.2.6 Efeito do tratamento com p-cimeno sobre a microcirculação *in situ*

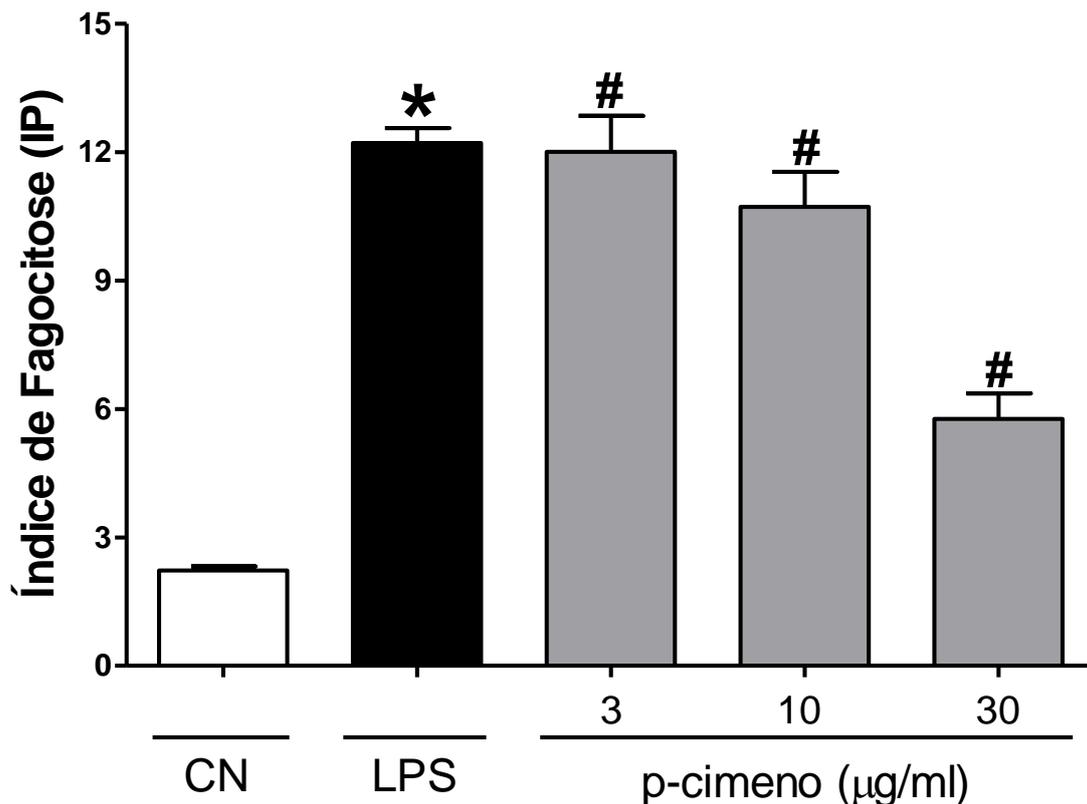
O efeito do tratamento com p-cimeno sobre o comportamento *rolling* e adesão de leucócitos foi avaliado *in situ* na microcirculação mesentérica de camundongos e os resultados estão apresentados na Figura 6. Duas horas após a injeção de carragenina (500 µg/cavidade, i.p), observou-se um aumento acentuado no número de leucócitos *rolling* e aderentes no endotélio vascular (Figura 6A e 6B). O pré-tratamento com p-cimeno, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, promoveu uma redução significativa no número de leucócitos *rolling* (41.1% e 62.6%, respectivamente), bem como o número de leucócitos aderentes foi reduzido pelo p-cimeno em todas as doses testadas (100, 200 e 400 mg/Kg), com as seguintes porcentagens de inibição: 55.8%, 72.6% e 56.5%, respectivamente. As drogas anti-inflamatórias de referência, indometacina e celecoxibe, diminuíram significativamente os leucócitos *rolling* (58.6% e 46.4%, respectivamente) e aderentes (34.7% e 23.2%, respectivamente) para o endotélio vascular (Figura 6A e 6B).



**Figura 6. Efeito do tratamento com p-cimeno sobre os leucócitos *rolling* (A) e aderentes (B) induzidos por carragenina.** Camundongos C57BL/6J foram tratados por via oral com p-cimeno (100, 200 ou 400 mg/Kg), indometacina (5 mg/Kg), celecoxibe (5 mg/Kg) ou veículo. Após 60 minutos, salina ou carragenina (500 µg/cavidade) foi injetada intraperitonealmente. Leucócitos *rolling* e aderentes foram avaliados 2 horas mais tarde, conforme descrito na seção 3.1.7. Os valores representam a média ± EPM (n= 5 animais por grupo). \*p < 0.05 comparado com a salina (controle negativo). #p < 0.05 comparado com o grupo que recebeu apenas carragenina (controle positivo) (One way - ANOVA, teste de Tukey).

### 3.2.7 Efeito do p-cimeno sobre a atividade fagocítica de macrófagos

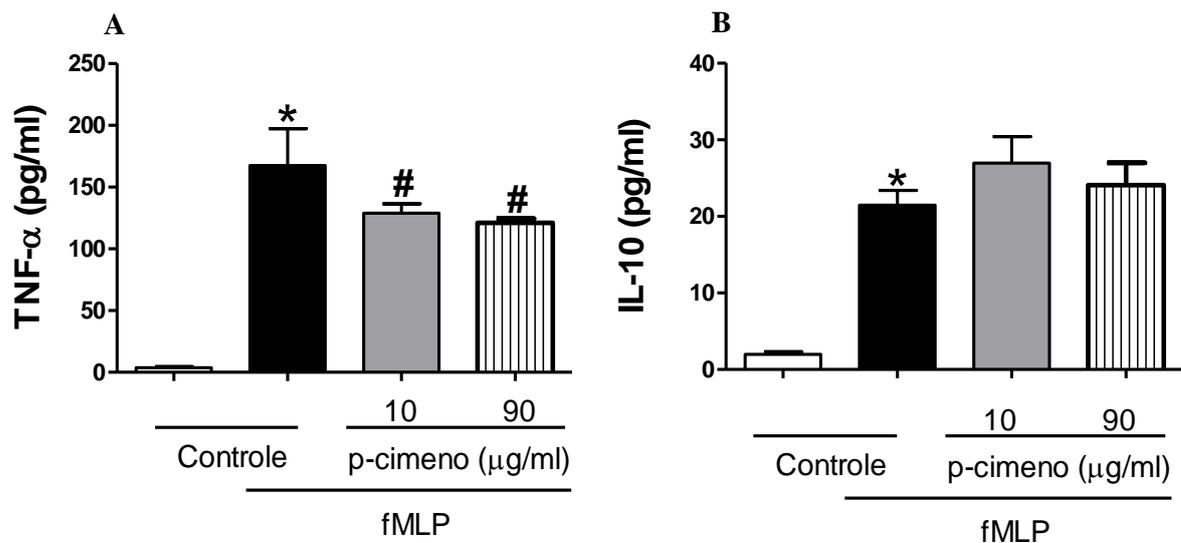
Visto que a atividade fagocítica é uma das mais importantes funções dos macrófagos, o efeito do p-cimeno, nas concentrações de 3, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , sobre esta atividade foi avaliada. Os resultados estão apresentados na Figura 7 e mostram que o p-cimeno estimulou significativamente a habilidade fagocítica dos macrófagos em todas as concentrações testadas, quando comparado com o grupo do controle negativo. Um efeito similar foi observado quando o LPS foi utilizado como controle positivo.



**Figura 7. Efeito do p-cimeno sobre a atividade fagocítica de macrófagos.** Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e a atividade fagocítica foi avaliada *in vitro* conforme descrito na seção 3.1.8. Os macrófagos peritoneais foram incubados com p-cimeno nas concentrações de 3, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ . LPS 20  $\mu\text{g/mL}$  foi utilizado como controle positivo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) e são representativos para três experimentos independentes. \* $P < 0.05$  comparado ao controle negativo (CN). # $p < 0.05$  comparado ao CN (One way - ANOVA, teste de Tukey).

### 3.2.8 Efeito do p-cimeno sobre os níveis de citocinas

Sabendo que as citocinas podem modular a resposta inflamatória, avaliou-se o efeito do p-cimeno sobre os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-10. Os resultados estão apresentados na Figura 8. O tratamento com p-cimeno inibiu significativamente a liberação de  $\text{TNF-}\alpha$  nas concentrações testadas (Figura 8A). Sobre os níveis de IL-10, não foram observadas alterações significativas (Figura 8B) em neutrófilos estimulados com fMLP.



**Figura 8.** Efeito do p-cimeno sobre os níveis de TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) em neutrófilos estimulados com fMLP. Os neutrófilos foram expostos aos diferentes tratamentos de p-cimeno (10 ou 90  $\mu\text{g/ml}$ ) ou ao meio RPMI 1640 (controle) por 30 minutos e estimulados com 0,1  $\mu\text{M}$  fMLP por 60 minutos (exceto o controle negativo). A quantificação das citocinas foi realizada através do ELISA. \*P < 0.05 comparado ao controle negativo. #p < 0.05 comparado com os neutrófilos estimulados com fMLP (controle positivo) (One way - ANOVA, teste de Tukey).

### 3.3 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram investigados os efeitos do p-cimeno, um monoterpene, sobre o processo inflamatório agudo utilizando modelos experimentais de quimiotaxia *in vitro*, peritonite, microcirculação *in situ*, fagocitose e quantificação de citocinas. Recentemente, algumas pesquisas têm relacionado a atividades antinociceptiva e anti-inflamatória aos monoterpenos, que são os componentes químicos majoritários encontrados nos óleos essenciais de várias espécies de plantas (43,53,80). Estudos prévios realizados por nossa equipe de pesquisa mostraram que o p-cimeno pode ser encontrado no óleo essencial do *Citrus latifolia* Tanaka (42).

A aplicação terapêutica dos produtos naturais, além de trazer benefícios à saúde, também está relacionada a eventos tóxicos (41,81). Alguns monoterpenos exibem questões problemáticas a respeito dos aspectos toxicológicos (82). Considerando esses dados, nos preocupamos em investigar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do p-cimeno. No ensaio de viabilidade celular (MTT) observamos que os diferentes tratamentos com o p-cimeno apresentaram baixa citotoxicidade frente aos neutrófilos, e esta informação é coerente com estudos similares, onde os autores demonstraram que o p-cimeno não apresentou qualquer citotoxicidade contra células da linhagem RAW 264.7, mesmo na maior concentração testada (428.65  $\mu\text{g/ml}$ ) (66). No teste de toxicidade aguda, em modelo animal, não registramos mortes e nem sinais de toxicidade nas doses analisadas (1, 2 e 3 g/kg). Então, iniciou-se a investigação dos efeitos anti-inflamatórios desse composto.

A inflamação ocorre como resultado da exposição dos tecidos aos estímulos nocivos. As manifestações físicas principais deste processo incluem o rubor, inchaço, calor, dor e a perda da

função (5). Em condições inflamatórias os neutrófilos atuam como a primeira linha de defesa no sistema imunológico humano, migrando para a área afetada e desempenhando funções específicas (15). A via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno p-38 (MAPK) são as vias de sinalização envolvidas no processo de quimiotaxia de neutrófilos (83). Pesquisas anteriores mencionaram que a inibição do recrutamento de leucócitos é capaz de reduzir sequelas associadas às condições inflamatórias (84), sendo assim, substâncias capazes de interferir no processo quimiotático podem ser promissoras para o tratamento das doenças inflamatórias, especialmente as crônicas.

Diante dessas informações, avaliamos o efeito direto do p-cimeno sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Nossos dados mostraram que o p-cimeno levou a uma redução significativa na quimiotaxia de neutrófilos, quando estas células foram estimuladas com o fMLP. Essa redução foi observada nas concentrações de 3, 10, 30 e 60 µg/mL. Em contrapartida, quando os neutrófilos foram estimulados com o LTB<sub>4</sub>, o p-cimeno não foi capaz de inibir significativamente a quimiotaxia, em nenhuma das concentrações testadas. Uma vez que o tratamento com esse monoterpene tenha mostrado baixo potencial citotóxico, os nossos resultados sugerem que o p-cimeno tem um efeito direto na inibição da migração de neutrófilos *in vitro*, quando estes são estimulados pelo fMLP.

Conforme descrito anteriormente, a via da MAPK desempenha um papel importante na quimiotaxia de neutrófilos e na migração celular, e está claro que a inibição desta via se torna prejudicial à quimiotaxia de neutrófilos, no entanto esse mecanismo não está bem esclarecido (83). Estudos recentes demonstraram que o p-cimeno bloqueou significativamente a atividade da MAPK durante a lesão pulmonar aguda (62,66), e esses achados podem explicar parcialmente o efeito inibitório do p-cimeno sobre a quimiotaxia de neutrófilos frente ao fMLP.

Muitos óleos essenciais têm demonstrado uma atividade anti-inflamatória expressiva através da redução da migração dos leucócitos para o foco inflamatório (27,43). Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou que estragol foi capaz de inibir o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal (85). Assim, o efeito do p-cimeno sobre a migração de leucócitos *in vivo* foi avaliado através da peritonite induzida por carragenina. A carragenina induz a migração de neutrófilos por mecanismo indireto, via a ativação dos macrófagos, que são células fontes de mediadores inflamatórios, tais como, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), metabólitos do ácido araquidônico e óxido nítrico (86,87). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com o p-cimeno, em todas as doses testadas, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares para a cavidade peritoneal, dando indícios de que este composto apresenta atividade anti-inflamatória. De fato, estudos recentes demonstraram que o tratamento com p-cimeno foi eficaz na inibição do recrutamento de células para o fluído broncoalveolar (88).

Visto que o p-cimeno reduziu a migração de leucócitos *in vitro* e *in vivo*, investigamos o seu efeito no comportamento dos leucócitos (rolantes e aderentes) nas vênulas pós-capilares mesentéricas, através da microcirculação *in situ*. Em resposta aos sinais inflamatórios, os leucócitos migram do meio

intravascular e se acumulam no tecido lesado, e esta migração ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares (89,90). O processo de migração celular é fundamental na resposta inflamatória, e envolve o rolamento, a adesão e a transmigração dos leucócitos para o espaço extravascular (91,92). Em um tecido inflamado é comum a liberação de moléculas quimiotáticas, como as citocinas, quimiocinas, leucotrienos e prostaglandinas (22,93), e as etapas da migração celular resultam principalmente da liberação desses mediadores, tanto por células residentes quanto por células infiltradas (94). Na microcirculação *in situ*, observamos que o pré-tratamento com o p-cimeno reduziu significativamente o número de leucócitos rolantes, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, enquanto que todas as doses testadas diminuíram de modo significativo o número de leucócitos aderidos ao endotélio vascular.

Os primeiros leucócitos a migrarem em direção a um gradiente quimiotático são os neutrófilos (15). Estas células rolam no endotélio vascular associadas a moléculas de adesão, como as selectinas (E e P-selectinas - expressas nas células endoteliais e L-selectinas expressa nos leucócitos) e seus respectivos ligantes. Após esta interação, sinais são acionados e levam à ativação das integrinas dos leucócitos, que se ligam com afinidade as moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, como as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão vascular (VCAM-1), necessárias para o processo de adesão dos leucócitos ao endotélio e posterior transmigração (20). Sabendo que a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  induz a expressão da E-selectina, ICAM e VCAM-1 (95) e nossos resultados demonstraram que o p-cimeno reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 8A), podemos sugerir que este composto age sobre o comportamento leucocitário, já que foi capaz de reduzir o rolamento, a adesão e a migração de leucócitos como observado em nosso trabalho. O processo inflamatório é uma resposta protetora ao organismo, no entanto uma intensa migração de leucócitos pode conduzir a danos teciduais, por isso, o surgimento de drogas que modulam o recrutamento de leucócitos é importante para a terapia anti-inflamatória, especialmente em inflamações crônicas, como na artrite reumatóide, por exemplo.

Pesquisas recentes demonstraram que o p-cimeno foi capaz de bloquear a atividade da MAPK, que está associada à síntese e a secreção de citocinas inflamatórias, e também a supressão da produção *in vivo* de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (62,66). O pré-tratamento com p-cimeno promoveu uma inibição mais intensa de leucócitos rolantes e aderentes do que os fármacos de referência. De fato, estudos relataram que o p-cimeno inativou o fator nuclear kappa B (NF-kB), um fator de transcrição nuclear capaz de regular a expressão de muitos genes imunes e inflamatórios, que envolvem as moléculas de adesão e as citocinas (66,96). Tomados em conjunto, os nossos dados sugerem que a atividade anti-quimiotática do p-cimeno através da redução de leucócitos rolantes e aderentes poderia estar envolvida ao NF-kB, como previamente observado por outros autores (62).

Os macrófagos se encontram estrategicamente distribuídos em todos os tecidos do corpo, onde desempenham inúmeras funções, especialmente na resposta a lesões e infecções (97,98). Entre outras funções, os macrófagos executam a fagocitose, através da ingestão e processamento de materiais

estranhos, restos de tecidos e células mortas. Além disso, recrutam macrófagos adicionais durante a lesão inflamatória e secretam mediadores pró-inflamatórios (99). O lipopolissacárido (LPS) é encontrado na parede celular de bactérias gram-negativas e é um potente iniciador da resposta inflamatória. Ele ativa os macrófagos por se ligar ao complexo receptor CD14/do tipo *Toll* (TLR4), o qual promove a fagocitose (100). Uma vez que a fagocitose é uma das funções mais importantes dos macrófagos, o efeito do p-cimeno na atividade fagocítica dos macrófagos foi avaliado.

Nossos resultados demonstraram que o p-cimeno estimulou significativamente a capacidade fagocitária dos macrófagos, em todas as concentrações testadas, quando comparado com o grupo controle negativo. Um efeito semelhante foi observado quando o LPS foi utilizado como controle positivo. Pesquisas anteriores relataram que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, que contém p-cimeno, também foi capaz de estimular a resposta fagocitária de macrófagos (101). Além do receptor TLR4 os macrófagos apresentam diversos outros receptores (receptores do complemento, receptores Fc, receptores da manose) que estão envolvidos no reconhecimento e na ligação de agentes patogênicos na superfície da célula (102). No entanto, sabe-se que a ativação de TLR e a fagocitose estão funcionalmente ligados (99,103). Sem dúvida, a expressão de TLR é crucial para a fagocitose de macrófagos e tem sido demonstrado que ocorre um aumento da expressão de TLR4 em macrófagos após a exposição ao LPS (103). Baseados nessas informações, podemos pensar que o p-cimeno também pode ter estimulado a fagocitose via a ligação com o receptor TLR4, mas esse mecanismo não está bem esclarecido e estudos futuros devem ser realizados para a confirmação desta hipótese.

Os neutrófilos ativados estão relacionados à síntese de diversas citocinas, dentre elas IL-1, IL-6, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que atuam como mediadores durante a resposta inflamatória (92). Conhecer os mecanismos de modulação de citocinas e quimiocinas derivadas de neutrófilos representa um passo essencial para uma melhor compreensão de como essas células podem influenciar os processos patofisiológicos (104) e contribuir para o desenvolvimento de novas drogas. O tratamento com o p-cimeno inibiu significativamente a liberação de TNF- $\alpha$ , e, não alterou significativamente os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, em neutrófilos estimulados com fMLP.

A inibição da atividade do NF- $\kappa$ B e da MAPK pelo p-cimeno pode estar relacionado com o efeito inibitório deste composto sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (62). TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, enquanto a IL-10 é uma citocina reguladora. TNF- $\alpha$  regula a expressão de moléculas de adesão, que podem causar danos para as células endoteliais vasculares e em altas concentrações locais podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos aderentes (92); enquanto a IL-10 promove um efeito inibitório sobre algumas respostas funcionais dos neutrófilos, incluindo produção de citocinas e quimiocinas (105). Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, que demonstraram que o p-cimeno diminuiu significativamente os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  após a estimulação com LPS, e, não alterou significativamente os níveis de IL-10 (66). Assim, podemos sugerir que o p-cimeno poderia estar modulando a resposta anti-inflamatória

através da atividade sinérgica entre a IL-10 e outras citocinas que conduzem a inibição de citocinas pró-inflamatórias.

### **3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O monoterpeno p-cimeno demonstrou possuir efeitos sobre o comportamento quimiotático de leucócitos, através da inibição de leucócitos rolantes e aderentes, modulados por citocinas, responsáveis pela regulação desses efeitos. Além disso, esse composto poderia ser considerado uma droga promissora como um agente anti-inflamatório, especialmente nos processos que decorrem da infiltração de leucócitos, tais como a artrite reumatóide. No entanto, mais estudos serão necessários para elucidar plenamente o seu mecanismo de ação.

## **4 ALFA-PINENO REDUZ A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DURANTE A INFLAMAÇÃO AGUDA**

Desde os primórdios da humanidade, os recursos terapêuticos utilizados pelo homem para o alívio de suas afecções eram derivados de fontes naturais (106). Atualmente, o interesse na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é crescente e os compostos naturais continuam sendo uma fonte significativa de substâncias biologicamente ativas que podem ser a base para a síntese de novos medicamentos (107).

As plantas aromáticas continuam sendo muito utilizadas na medicina popular. As suas propriedades farmacêuticas são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais, que são misturas complexas de metabólitos secundários voláteis, constituídos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, entre outros compostos como alcoóis, éteres, aldeídos e cetonas (108,109). Os óleos essenciais apresentam uma grande diversidade estrutural e atividades biológicas distintas, como por exemplo, anti-inflamatória, antioxidante, antineoplásica e antimicrobiana (50,110,111).

O alfa-pineno é um metabólito secundário, pertencente à classe dos monoterpenos bicíclicos, empregado em diferentes processos industriais (52). Este monoterpeno pode ser isolado de óleos essenciais de diferentes espécies, tais como o *Citrus latifolia* Tanaka, *Rosmarinus officinalis*, *Hymenocrater longiflorus*, *Hyptis spicigera* e também em muitas espécies de árvores coníferas, especialmente no pinheiro (42,68,112). Algumas atividades biológicas estão descritas para este composto, como, antinociceptiva, anti-alérgico, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (52,67,69,113).

Todavia, estudos científicos relacionados à atividade anti-inflamatória do alfa-pineno são raros, e seus efeitos sobre a quimiotaxia de leucócitos e o comportamento celular durante o processo inflamatório ainda precisam ser explorados. Logo, este estudo foi realizado no intuito de avaliar a atividade anti-inflamatória do alfa-pineno sobre o comportamento leucocitário através da migração de leucócitos *in vitro* e *in vivo*.

### **4.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1.1 Matéria vegetal e obtenção do constituinte isolado**

Os frutos de *Citrus latifolia* Tanaka foram adquiridos na feira do produtor da cidade de Maringá-PR, no mês de maio de 2009. O óleo essencial foi obtido das raspas dos flavedos dos frutos de *Citrus latifolia* Tanaka previamente resfriados em geladeira. As massas dos flavedos foram submetidas à hidrodestilação durante 2 horas, utilizando-se o aparato de Clevenger. O óleo essencial obtido foi separado, seco com sulfato de sódio anidro, e armazenado ao abrigo da luz, a temperatura de 4° C. O constituinte alfa-pineno foi isolado a partir do óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka como

frações de óleo hidrodestilado, e foi identificado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , como descrito anteriormente (42).

#### 4.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J (17 - 20 g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais, foram mantidos em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob ciclo claro-escuro 12/12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEAE/UEM 066/2010).

#### 4.1.3 Determinação da atividade citotóxica

Os ensaios biológicos para avaliar a atividade citotóxica *in vitro* foram realizados seguindo o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio; Sigma<sup>®</sup>), que é um teste colorimétrico baseado na redução do MTT por enzimas mitocondriais formando os cristais de formazan de cor violeta. Essa redução só ocorre quando as enzimas mitocondrias são ativas e, portanto, a conversão pode ser diretamente relacionada ao número de células viáveis (77).

Para este ensaio, neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem C57BL/6J, 4 horas após a injeção intraperitoneal com 1mg/cavidade de Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para a coleta das células, os animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de PBS, pH 7,4 contendo EDTA. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm/10 minutos a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Os neutrófilos foram ressuspendidos em meio RPMI 1640 completo e contados em câmara de Neubauer. Na sequência, os mesmos foram plaqueados na densidade de  $5 \times 10^5$  por poço, em microplaca de 96 poços e expostos aos diferentes tratamentos de alfa-pineno (3, 10, 30 ou 90  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo período de 1 hora e 30 minutos, com a placa incubada, protegida da luz, a  $37^\circ\text{C}$ , com atmosfera a 5% de  $\text{CO}_2$ . As emulsões de alfa-pineno foram preparadas com meio RPMI 1640 e emulsionadas por sonicação. Em seguida, foram adicionados 10 $\mu\text{L}$  de MTT, a placa foi incubada nas mesmas condições descritas acima por 2 horas. Após este período o MTT foi retirado, e foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), a placa foi incubada por 10 minutos e a leitura foi realizada em 540 nm em leitor de microplaca - Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom<sup>®</sup>). A porcentagem da viabilidade celular (PVC) foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Absorbância das células tratadas} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

#### 4.1.4 Teste de toxicidade aguda

Estudos de toxicidade foram realizados em camundongos machos da linhagem C57BL/6J. Os animais (n=5 animais por grupo) foram mantidos em jejum durante a noite e então tratados, oralmente (gavagem), com alfa-pineno (1, 2 e 3 g/Kg de peso corporal) ou veículo (0,2% - solução aquosa de Tween 80) para o grupo controle. Após o tratamento os animais foram observados durante 7 dias. Comida e água foram fornecidas durante todo o experimento. Neste período de observação foi registrado o número de mortes entre os animais de cada grupo e a determinação da DL50 foi realizada de acordo com a literatura (78).

#### **4.1.5 Ensaio de quimiotaxia *in vitro***

O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizado em micro câmara de Boyden modificada (48 poços; Neuro Probe, Inc., Cabin John, MD–USA) usando filtro de policarbonato (5 µm, 25x80 mm, 50 Pk, GE Water & Proces Technologies) conforme ilustrado na Figura 3.

Neste ensaio, os neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem C57BL/6J, 4 horas após a injeção intraperitoneal com 1mg/cavidade de Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para a coleta das células, os animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL PBS, pH 7,4 contendo EDTA. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm/10 minutos a temperatura de 4°C. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e sua viabilidade avaliada pelo teste de exclusão do corante Azul de Tripán. As suspensões consideradas ideais foram aquelas com viabilidade superior a 95% de células íntegras.

Os neutrófilos,  $1 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura RPMI 1640 acrescido BSA à 0,1%, foram incubados, antes do estímulo quimiotático, com diferentes concentrações do alfa-pineno (1, 3, 10 ou 30 µg/mL) por 30 minutos. As emulsões de alfa-pineno foram preparadas com meio RPMI 1640 e emulsionadas por sonicação. Como controles, neutrófilos foram incubados apenas com o meio RPMI 1640. Na montagem da câmara de Boyden, inicialmente foi adicionado no compartimento inferior 26 µL de fMLP ( $10^{-6}$ M) ou LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$ M) e o controle negativo RPMI 1640. A seguir foi colocado sobre o compartimento inferior um filtro de policarbonato e acima deste uma membrana de polietileno, sobre os quais o compartimento superior da câmara foi encaixado. Neste compartimento (superior) foram adicionados 50 µL de cada suspensão de neutrófilos pré-tratados. A câmara foi incubada a 37°C com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> pelo período de 1 hora. Posteriormente, o filtro foi removido, fixado em lâmina e corado [kit Instant - Prov (Newprov<sup>®</sup>)]. Os neutrófilos que migraram através do filtro foram contados, em cinco campos selecionados aleatoriamente, utilizando microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por campo, representativos de três experimentos separados.

#### **4.1.6 Peritonite induzida por carragenina**

O ensaio de peritonite, para avaliar a migração de leucócitos *in vivo*, foi realizado com camundongos da linhagem C57BL/6J. Os animais foram previamente tratados, por via oral (gavagem), com alfa-pineno (100, 200 ou 400 mg/Kg de peso corporal), indometacina (5 mg/Kg - controle positivo, anti-inflamatório não esteroidal de referência) ou veículo (0,2% - solução aquosa de Tween 80, 0.1mL) como controle. A peritonite foi induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina na concentração 500  $\mu$ g por cavidade ou um volume equivalente de veículo (solução salina), 30 minutos após os respectivos tratamentos. Após 4 horas da injeção de carragenina, os animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de PBS, pH 7,4 contendo EDTA. Em seguida, o lavado peritoneal foi coletado, centrifugado a 1000 rpm/10 minutos e o sedimento foi utilizado para as contagens totais e diferenciais de leucócitos. Os resultados foram expressos como número de leucócitos por cavidade.

#### 4.1.7 Migração de leucócitos *in vivo*

Os processos de *rolling* e adesão endotelial de leucócitos foram utilizados como parâmetros para avaliar a migração de leucócitos. Para isso, o tecido mesentérico de camundongos machos da linhagem C57BL/6J foi exposto para o exame microscópico *in situ*.

Previamente, os diferentes grupos de animais foram tratados, por via oral, com alfa-pineno (100, 200 ou 400 mg/Kg de peso corporal), indometacina (5 mg/Kg - controle positivo, anti-inflamatório não esteroidal de referência) celecoxibe (5 mg/Kg - controle positivo, anti-inflamatório não esteroidal de referência) ou veículo (0,2% - solução aquosa de Tween 80). A suspensão de carragenina (500  $\mu$ g/cavidade) foi injetada intraperitonealmente, 1 hora após os respectivos tratamentos. Após um período de 2 horas, os animais foram anestesiados (cetamina/xilazina 1:1). Iniciou-se então o procedimento para a exposição do tecido mesentérico, que se deu através de uma incisão longitudinal da pele e do músculo abdominal do lado direito do corpo dos animais. Durante o ensaio os animais foram mantidos em uma placa especial com plataforma transparente onde o tecido mesentérico foi fixado. Esta placa foi mantida à 37° C e a preparação mantida úmida e quente, com solução de Ringer-Locke com gelatina a 1% (pH 7,2-7,4).

Os vasos selecionados para o estudo foram as vênulas pós-capilares com diâmetro de 18-25  $\mu$ m. O número de leucócitos com comportamento *rolling* e aderidos ao endotélio foi determinado em intervalos de 5 minutos. Como leucócitos aderentes considerou-se apenas os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio venular por mais de 30 segundos. As células foram contadas na imagem gravada com três campos diferentes para cada animal, para evitar a variabilidade devida à amostragem, e o valor médio foi calculado.

#### 4.1.8 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da

média (EPM) para cada grupo. A comparação estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.  $P < 0.05$  foi considerado como nível de significância.

## **4.2 RESULTADOS**

### **4.2.1 Efeito do alfa-pineno sobre a citotoxicidade de neutrófilos**

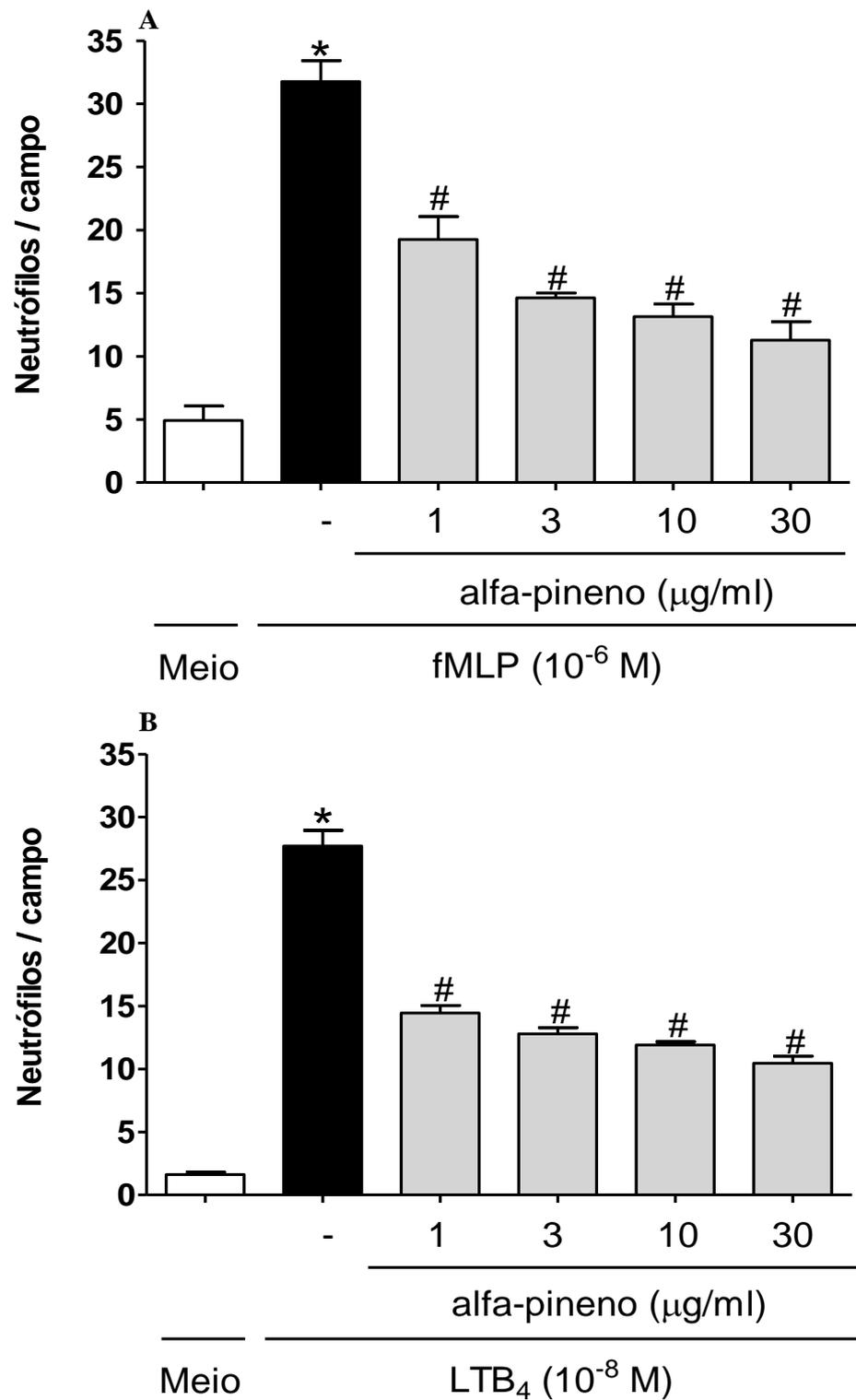
Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6J e a citotoxicidade foi avaliada frente às diferentes concentrações de alfa-pineno. Neste ensaio o composto alfa-pineno apresentou uma viabilidade celular de 95%, 94%, 88% e 84% para as concentrações testadas (3, 10, 30 e 90  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

### **4.2.2 Efeito do alfa-pineno sobre a toxicidade aguda**

Camundongos machos C57BL/6J foram oralmente tratados, uma única vez, com alfa-pineno nas doses de 1, 2 e 3 g/Kg e observados durante 7 dias. A toxicidade aguda do alfa-pineno foi baixa, pois durante este período nenhuma morte ou sinais de toxicidade foram evidenciados, impossibilitando a realização do cálculo de DL50 para esta via.

### **4.2.3 Efeito do alfa-pineno sobre a quimiotaxia *in vitro***

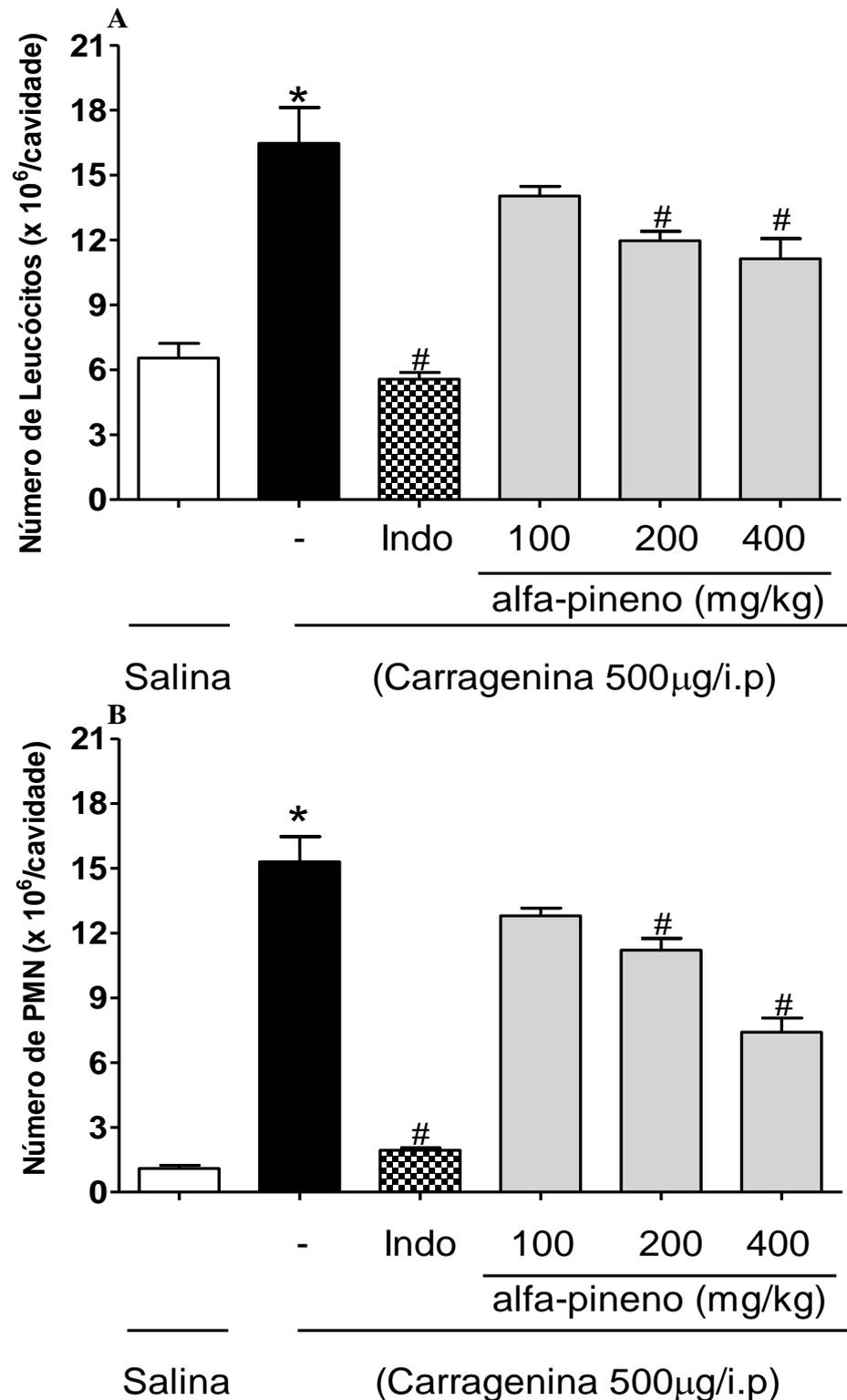
O efeito das diferentes concentrações de alfa-pineno sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, está apresentado na Figura 9. O alfa-pineno nas concentrações de 1, 3, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$  causou uma inibição significativa da migração de neutrófilos estimulada pelo agente quimiotático fMLP. A porcentagem de inibição para cada concentração do alfa-pineno foi de 39.3%, 53.9%, 58.6% e 64.5%, respectivamente (Figura 9A). O tratamento com alfa-pineno nas mesmas concentrações (1, 3, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) também inibiu a migração de neutrófilos estimulada pelo agente quimiotático LTB<sub>4</sub>. A porcentagem de inibição para cada concentração do alfa-pineno foi de 47.8%, 53.8%, 57.1% e 62.2%, respectivamente (Figura 9B).



**Figura 9. Efeito inibitório do alfa-pineno na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.** Os neutrófilos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos após indução de peritonite com zymosan (1 mg/cavidade). A quimiotaxia dos neutrófilos foi estimulada com fMLP ( $10^{-6}$ M) (A) ou LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$ M) (B) após 30 minutos de incubação com alfa-pineno nas concentrações de 1, 3, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ . O procedimento de quimiotaxia foi realizado em câmara de Boyden conforme descrito na seção 4.1.5. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n = 5) e foram representativos para 3 experimentos independentes. \*p < 0.05 comparado com meio (RPMI 1640). #p < 0.05 comparado com o grupo de neutrófilos estimulados com fMLP ou LTB<sub>4</sub> (One way - ANOVA, teste de Tukey).

#### **4.2.4 Efeito do tratamento com alfa-pineno sobre a migração celular no exsudato peritoneal de camundongos**

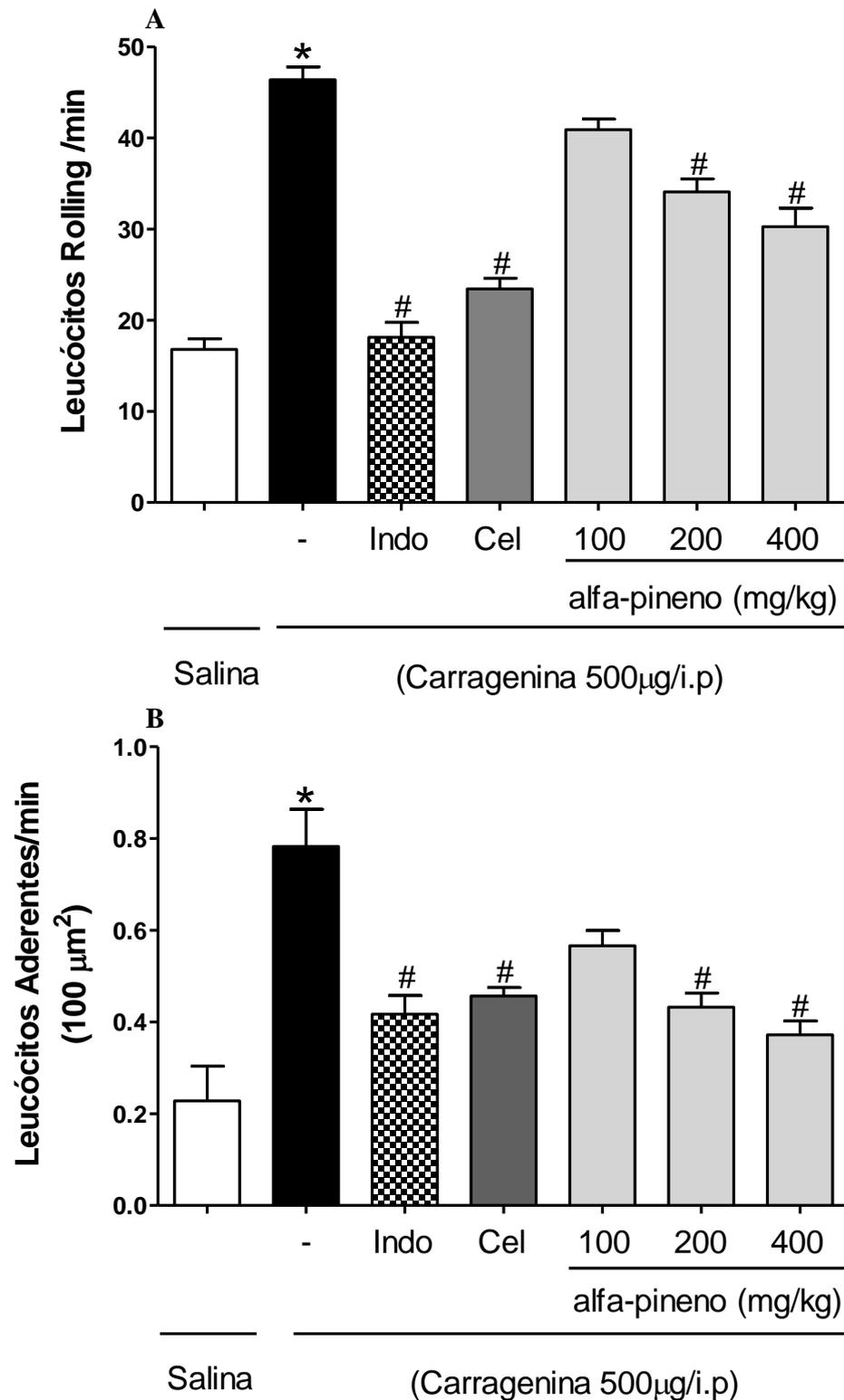
A Figura 10 mostra o número de leucócitos totais e polimorfonucleares que migraram para a cavidade peritoneal de camundongos tratados e não tratados com alfa-pineno. Após 4 horas da indução da peritonite com carragenina, observou-se um aumento no número de leucócitos no exsudato peritoneal ( $16.47 \pm 1.65 \times 10^6$  células/cavidade) quando comparadas com o grupo controle (veículo) ( $6.53 \pm 0.67 \times 10^6$  células/cavidade). O tratamento dos animais com alfa-pineno nas doses de 200 e 400mg/Kg reduziu significativamente a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal (27.3% e 32.4%, respectivamente) (Figura 10A), e essa diminuição foi acompanhada por uma redução significativa na infiltração de polimorfonucleares (26.7% e 51.6%, respectivamente) nas mesmas doses (Figura 10B). O anti-inflamatório de referência (indometacina - 5 mg/Kg) também reduziu significativamente o número de leucócitos totais (66.2%) e polimorfonucleares (87.3%).



**Figura 10.** Efeito do tratamento com alfa-pineno sobre a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares (PMN) para a cavidade peritoneal. Camundongos C57BL/6 foram tratados por via oral com alfa-pineno (100, 200 ou 400 mg/Kg), indometacina (5 mg/Kg) ou veículo e, após 30 minutos, foi induzida a peritonite com carragenina (500µg/camundongo, i.p.). O número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal 4 horas após a injeção de carragenina foi determinada conforme descrito na seção 4.1.6. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). \* $p < 0.05$  comparado com salina (controle negativo). # $p < 0.05$  comparado com o grupo que recebeu carragenina (controle positivo) (One-way ANOVA, teste de Tukey).

#### **4.2.5 Efeito do pré-tratamento com alfa-pineno sobre a microcirculação *in situ***

O efeito do tratamento com alfa-pineno sobre o comportamento *rolling* e adesão de leucócitos foi avaliado *in situ* na microcirculação mesentérica de camundongos e os resultados estão expressos na Figura 11. Duas horas após a injeção de carragenina (500 µg/cavidade, i.p), observou-se uma elevação acentuada no número de leucócitos *rolling* e aderentes no endotélio vascular (Figura 11A e 11B). O pré-tratamento com alfa-pineno nas doses de 200 e 400 mg/Kg promoveu uma redução significativa no número de leucócitos *rolling* (26.5% e 34.7%, respectivamente) e aderentes (44.8% e 52.4%, respectivamente). As drogas anti-inflamatórias de referência, indometacina e celecoxibe, também diminuíram significativamente os leucócitos *rolling* (60.9% e 49.4%, respectivamente) e aderentes (47.4% e 42.3%, respectivamente) para o endotélio vascular (Figura 11A e 11B).



**Figura 11. Efeito do pré-tratamento com alfa-pineno sobre os leucócitos *rolling* (A) e aderentes (B) induzidos por carragenina.** Camundongos C57BL/6J foram tratados por via oral com alfa-pineno (100, 200 ou 400 mg/Kg), indometacina (5 mg/Kg), celecoxibe (5 mg/Kg) ou veículo. Após 60 minutos, salina ou carragenina (500 μg/cavidade) foi injetada intraperitonealmente. Leucócitos *rolling* e aderentes foram avaliados 2 horas mais tarde, conforme descrito na seção 4.1.7. Os valores representam a média ± EPM (n= 5 animais por grupo). \*p < 0.05 comparado com a salina (controle negativo). #p < 0.05 comparado com o grupo que recebeu apenas carragenina (controle positivo) (One way - ANOVA, teste de Tukey).

### 4.3 DISCUSSÃO

Os monoterpenos são produtos naturais pertencentes ao grupo químico dos terpenos, e são as moléculas mais representativas na composição dos óleos essenciais (41). Eles exibem diversas funções bioativas e são comuns em preparações cosméticas e farmacêuticas (36,50). No presente estudo foi demonstrado que o monoterpeno alfa-pineno, isolado a partir de óleo essencial *Citrus latifolia* Tanaka, interferiu no comportamento leucocitário, reduzindo o recrutamento de neutrófilos em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Segundo a literatura alguns os óleos essenciais podem exercer efeitos citotóxicos em células eucarióticas, no entanto, a fim de confirmar esses efeitos muitos estudos estão sendo realizados para avaliar a toxicidade dos componentes isolados de óleos essenciais, de modo que eles possam ser utilizados com segurança (82,114). Assim, previamente à avaliação do potencial anti-inflamatório do alfa-pineno, investigou-se a citotoxicidade deste monoterpeno frente aos neutrófilos, utilizando o método de redução do MTT. Nossos resultados indicaram que o tratamento com alfa-pineno demonstrou baixa citotoxicidade, pois as células incubadas com os diferentes tratamentos permanecem viáveis (> 84%), mesmo quando expostas à concentração mais elevada (90 µg/mL). De encontro com nossos resultados, estudos anteriores relataram que o alfa-pineno, em concentrações abaixo de 200 mg/L por 24 horas, não causou alteração na viabilidade em cultura de células sanguíneas humanas (52).

Após observarmos a baixa citotoxicidade do alfa-pineno no ensaio *in vitro*, avaliamos seus efeitos sobre a toxicidade aguda em modelo animal, onde mortes e sinais de toxicidade não foram registrados nas doses de até 3 g/kg, administrados por via oral. Ensaio de toxicidade com o óleo essencial de *Hyptis spicigera* Lam, onde o alfa-pineno é o constituinte majoritário também não demonstraram toxicidade e mortalidade com dose de 100 mg/Kg (112). Diante dos resultados, pesquisamos os efeitos do alfa-pineno sobre a migração de leucócitos *in vitro* e *in vivo*.

O processo inflamatório é uma medida de proteção tomada pelo organismo a fim de eliminar os estímulos lesivos. Independente do fator desencadeante, os sinais inflamatórios incluem a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para a área lesada (50,115). Durante uma resposta inflamatória, os leucócitos circulantes deixam o compartimento intravascular e migram em direção ao foco inflamatório, através da quimiotaxia, no intuito de eliminar o agente prejudicial e promover a reparação do tecido (116). Esta resposta envolve a interação de várias moléculas, como as selectinas, as integrinas, as moléculas de adesão intercelular, as moléculas de adesão vascular, além de citocinas e quimiocinas (117). No entanto, uma resposta inflamatória desequilibrada, acompanhada por uma migração persistente de leucócitos, pode levar à lesão tecidual (118). Dessa forma, drogas que inibem a quimiotaxia podem ser uma estratégia terapêutica promissora para algumas afecções inflamatórias, incluindo as inflamações crônicas, como por exemplo, a artrite reumatóide.

Perante a relevância da quimiotaxia durante a inflamação, verificamos o efeito direto do alfa-pineno sobre este processo, utilizando a câmara de Boyden como modelo experimental e fMLP ( $10^{-6}$  M) e LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$  M) como agentes quimiotáticos. Nossos resultados mostraram que o alfa-pineno, em todas as concentrações testadas, promoveu uma redução significativa na quimiotaxia de neutrófilos, tanto em resposta à estimulação ao fMLP quanto em resposta ao LTB<sub>4</sub>. Uma vez que o tratamento com alfa-pineno não afetou a viabilidade dos neutrófilos, avaliada por meio do ensaio de citotoxicidade, os nossos dados sugerem que este composto tem um efeito direto na inibição da migração de neutrófilos, e que esse efeito parece não estar relacionado à toxicidade.

O fMLP, um peptídeo n-formilado, é derivado de bactérias e se liga a receptores encontrados na superfície de neutrófilos, ativando diferentes vias de sinalização envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos e na produção e liberação de citocinas, tais como a via da proteína quinase ativada por mitógeno p-38 (MAPK) e a via do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (119,120). O LTB<sub>4</sub>, um produto biologicamente ativo da via da lipoxigenase, é um quimioatratador extremamente potente, capaz de modular diversas funções, incluindo o recrutamento e a ativação de leucócitos através das ligações a receptores na superfície celular, acoplados à proteína G, em especial o receptor de BLT1 (121,122). Pesquisas recentes executadas em nosso laboratório demonstraram que outros monoterpenos também reduziram a migração de leucócitos estimulada por fMLP e por LTB<sub>4</sub>, provavelmente pelos efeitos inibitórios destes compostos sobre a síntese e liberação de citocinas (42,53). Assim, sugere-se que os mecanismos ativados por estes quimioatratantes (fMLP e LTB<sub>4</sub>) podem ser inibidos por alfa-pineno.

Adicionalmente, a atividade anti-inflamatória do alfa-pineno foi investigada na peritonite induzida por carragenina, um modelo experimental que é muito usado para avaliar o efeito de drogas com potencial anti-inflamatório. Durante a inflamação induzida por carragenina há a participação de vários mediadores químicos, na fase precoce é possível a detecção de serotonina, histamina e bradicinina, enquanto que na fase tardia são detectáveis os metabólitos do ácido araquidônico, como por exemplo, as prostaglandinas (87). Além disso, observa-se uma elevação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 e a IL-1 $\beta$ , bem como um aumento de óxido nítrico no local da lesão (123,124). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com o alfa-pineno, nas doses de 200 e 400 mg/Kg, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares para a cavidade peritoneal, evidenciando que este composto apresenta atividade na inflamação. Estudos anteriores relataram que o pré-tratamento com alfa-pineno reduziu a infiltração de neutrófilos e a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6) durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína (68). Ademais, outros autores sugeriram que o alfa-pineno pode ser um composto promissor na inibição do óxido nítrico (125). Os monoterpenos p-cimeno e borneol também apresentaram atividade anti-inflamatória por meio da redução da migração de leucócitos neste mesmo modelo experimental (51,65). Assim, nossos dados sugerem que o alfa-pineno reduz o recrutamento de leucócitos induzido por carragenina provavelmente através de efeitos inibitórios sobre a produção ou liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, prostaglandinas e o óxido nítrico.

Os mecanismos pelos quais o alfa-pineno modula a migração de leucócitos para o foco inflamatório foram investigados utilizando o sistema de microscopia intravital. Os animais foram pré-tratados com alfa-pineno e as interações leucócito-endotélio (rolamento e adesão), *in vivo*, foram analisadas nas vênulas pós-capilares mesentéricas. O extravasamento de leucócitos do compartimento intravascular para os tecidos lesados ocorre majoritariamente nas vênulas pós-capilares, sendo mediado por uma série de processos mecânicos, químicos e moleculares, que iniciam com a marginalização dos leucócitos, seguida pelo rolamento, adesão firme ao endotélio vascular e a transmigração para a área lesada (16,19). Estes eventos são mediados pela expressão coordenada de moléculas de adesão vascular, fatores quimiotáticos e citocinas (89). Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com o alfa-pineno foi capaz de interferir no comportamento leucocitário, diminuindo o rolamento e a adesão dos leucócitos para o endotélio vascular, nas doses de 200 e 400 mg/Kg.

Além disso, em nossos experimentos, o pré-tratamento dos animais com as drogas anti-inflamatórias de referência (indometacina e celecoxibe) promoveu uma redução significativa no rolamento e na adesão dos leucócitos no endotélio vascular. Os efeitos anti-inflamatórios do celecoxibe estão relacionados com a redução da regulação positiva da P-selectina e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (126,127), enquanto que a indometacina, além de inibir a síntese de prostaglandinas, que leva a uma redução do fluxo sanguíneo e prejudica a migração de leucócitos, também reduz a produção de citocinas importantes, como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (128).

Conforme mencionado anteriormente, o alfa-pineno reduziu o rolamento e a adesão de leucócitos, e estes resultados sugerem que a atividade do alfa-pineno modula as interações leucócito-endotélio e, conseqüentemente, a migração de leucócitos. Deste modo, os efeitos do alfa-pineno podem estar associados com a redução de expressão de moléculas de adesão e a inibição da síntese de prostaglandinas, semelhante aos efeitos dos anti-inflamatórios de referência. No entanto, essa hipótese precisa ser mais explorada.

Recentemente, foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que outros compostos isolados de óleos essenciais, como o p-cimeno e o estragol, reduziram a migração de leucócitos *in vivo*, modulados por citocinas (65,85). Na verdade, estudos anteriores relataram que o alfa-pineno foi capaz de inibir a translocação nuclear do fator nuclear kappa B (NF-kB) (129), que é um elemento regulador da expressão gênica e quando ativo controla as etapas iniciais do processo inflamatório vascular, especificamente, a adesão leucocitária e a quimiotaxia (130). Portanto, a partir destes dados, podemos pensar que os efeitos inibitórios do alfa-pineno sobre o comportamento dos leucócitos poderiam incluir as ações inibitórias sobre o NF-kB, que conduz a uma redução da expressão de diferentes mediadores inflamatório. Contudo, novos estudos devem ser realizados para elucidar este mecanismo.

#### **4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os nossos dados mostraram que o alfa-pineno apresentou um efeito inibitório significativo sobre a migração de leucócitos, uma etapa crucial da resposta inflamatória. Estes efeitos biológicos do alfa-pineno indicam que este composto pode ser promissor no tratamento de doenças inflamatórias que apresentam uma migração excessiva de leucócitos, como por exemplo, a artrite reumatóide. No entanto, mais estudos serão necessários para confirmar esta possibilidade.

## 5 CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou que os monoterpenos p-cimeno e alfa-pineno, extraídos do óleo essencial do *Citrus latifolia* Tanaka, possuem uma baixa citotoxicidade frente aos neutrófilos *in vitro*;
- Tanto o tratamento com o p-cimeno quanto o tratamento com o alfa-pineno não apresentaram sinais de toxicidade aguda, em modelo animal, nas doses testadas;
- O composto p-cimeno reduziu a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* estimulada pelo fMLP; inibiu a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares para a cavidade peritoneal de camundongos; diminuiu o número de leucócitos *rolling* e aderentes durante a microcirculação mesentérica; estimulou a atividade fagocítica de macrófagos; reduziu os níveis da citocina TNF- $\alpha$  e não alterou significativamente os níveis de IL-10.
- O composto alfa-pineno inibiu a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* estimulada por fMLP e por LTB<sub>4</sub>; reduziu a infiltração de leucócitos totais e polimorfonucleares para a cavidade peritoneal de camundongos e o número de leucócitos *rolling* e aderentes para o endotélio vascular.
- Os dois monoterpenos avaliados demonstraram efeitos sobre o comportamento quimiotático de leucócitos.
- Este trabalho, por meio de ensaios biológicos realizados com o p-cimeno e o alfa-pineno, acrescenta informações importantes associadas ao potencial anti-inflamatório destes monoterpenos.
- Desta forma, estas drogas poderiam ser promissoras no tratamento de processos inflamatórios com migração excessiva de leucócitos, especialmente nos processos crônicos, tais como a artrite reumatóide. Entretanto, estudos adicionais serão necessários para esclarecer melhor o mecanismo de ação destes monoterpenos.

## REFERÊNCIAS

1. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2011 May 1;31(5):986–1000. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
2. Kutlubay Z, Tuzun Y, Wolf R, Engin B. Cutaneous inflammatory lipid mediators. *Skinmed*. United States; 2014;12(6):350–6.
3. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 2014;40(3):315–27.
4. Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 Jun;1851(6):882–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198114002583>
5. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1843(11):2563–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
6. Poon DC, Ho Y, Chiu K, Wong H, Chang RC. Sickness: From the focus on cytokines, prostaglandins, and complement factors to the perspectives of neurons. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2015 Oct;57:30–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763415002006>
7. Feghali C a, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 1997;2:12–26.
8. Aoki T, Narumiya S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(6):304–11.
9. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1?? generation [Internet]. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007. p. 227–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x>
10. Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: A systematic review. *Can J Cardiol*. 2011;27(2):174–82.
11. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF-κB. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2010 Apr;42(4):519–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272509003690>
12. Poon DCH, Ho YS, Chiu K, Chang RCC. Cytokines: How important are they in mediating sickness? *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(1):1–10.
13. Li X, Mai J, Virtue A, Yin Y, Gong R, Sha X, et al. IL-35 Is a Novel Responsive Anti-inflammatory Cytokine — A New System of Categorizing Anti-inflammatory Cytokines. Ryffel B, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 16;7(3):e33628. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033628>

14. Schmidt S, Moser M, Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;55(1):49–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.11.006>
15. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Mar [cited 2014 Jul 10];13(3):159–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>
16. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: Flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;55(1):59–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.025>
17. Henderson RB, Hobbs JAR, Mathies M, Hogg N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*. 2003;102(1):328–35.
18. McGettrick HM, Butler LM, Buckley CD, Ed Rainger G, Nash GB. Tissue stroma as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012;91(March):385–400.
19. Bianchi E, Molteni R, Pardi R, Dubini G. Microfluidics for in vitro biomimetic shear stress-dependent leukocyte adhesion assays. *J Biomech* [Internet]. Elsevier; 2013;46(2):276–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.10.024>
20. Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol*. 2012;42:278–83.
21. Bessa X, Elizalde JI, Mitjans F, Piñol V, Miquel R, Panés J, et al. Leukocyte recruitment in colon cancer: role of cell adhesion molecules, nitric oxide, and transforming growth factor beta1. *Gastroenterology*. 2002;122:1122–32.
22. Jin T. Gradient sensing during chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Oct [cited 2014 Sep 22];25(5):532–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23880435>
23. McDonald B, Kubes P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J Mol Med*. 2011;89(11):1079–88.
24. Woodfin A, Voisin M, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(1):9–17.
25. Menezes GB, Rezende RM, Pereira-Silva PEM, Klein A, Cara DC, Francischi JN. Differential involvement of cyclooxygenase isoforms in neutrophil migration in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2008;598(2008):118–22.
26. Wilkinson PC. Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Immunol Methods*. 1998;216(1-2):139–53.
27. Nogueira de Melo GA, Grespan R, Fonseca JP, Farinha TO, Silva EL, Romero AL, et al. *Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits in vivo and in vitro leukocyte migration. *J Med Food* [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 Oct 8];14(9):944–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663474>
28. Nogueira de Melo GA, Grespan R, Fonseca JP, Farinha TO, da Silva EL, Romero AL, et al. Inhibitory effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in

- vivo and in vitro. *J Nat Med* [Internet]. 2010 Jan;65(1):241–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11418-010-0479-5>
29. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001. p. 603–13.
  30. Gu R, Wang Y, Long B, Kennelly E, Wu S, Liu B, et al. Pharmacologically Active Constituents from Plants Used in Traditional Medicine. Prospecting for Bioactive Constituents from Traditional Medicinal Plants through Ethnobotanical Approaches. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(June):903–15.
  31. Lota ML, De Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *J Agric Food Chem*. 2002;50(4):796–805.
  32. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phyther Res* [Internet]. 2007 Apr;21(4):308–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2072>
  33. Ncube B, Van Staden J. Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. *Molecules* [Internet]. 2015;20(7):12698–731. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/12698/>
  34. De Souza, GHB., de Mello, JCP., Lopes N. *Farmacognosia Coletânea Científica*. 2012;372.
  35. Rozza AL, Moraes TDM, Kushima H, Tanimoto A, Marques MOM, Bauab TM, et al. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and  $\beta$ -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E. *Chem Biol Interact* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Jan 15 [cited 2014 Sep 23];189(1-2):82–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20934418>
  36. Miguel MG. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2014 Sep 25];15(12):9252–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160452>
  37. Fornari T, Vicente G, Vázquez E, García-Risco MR, Reglero G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;1250:34–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.051>
  38. Asbahani A El, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils : From extraction to encapsulation. 2015;483:220–43.
  39. Sangwan NS, Farooqi a H a, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul*. 2001;34:3–21.
  40. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phyther Res* [Internet]. 2009;24(5):n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2955>
  41. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2008):446–75.
  42. Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Silva EL, Bersani-Amado CA, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of citrus latifolia Tanaka essential oil and

- limonene in experimental mouse models. Evidence-based Complement Altern Med. 2013;2013:1–8.
43. Yamada AN, Grespan R, Yamada ÁT, Silva EL, Silva-Filho SE, Damião MJ, et al. Anti-inflammatory Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil in Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. *Am J Chin Med* [Internet]. 2013 Jan;41(04):913–26. Available from: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X13500614>
  44. Carrasco FR, Schmidt G, Romero AL, Sartoretto JL, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, et al. Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor- and cell-mediated responses. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(7):961–7.
  45. Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Machado Rocha LR, Marques MO, et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem Biol Interact*. 2009;180(3):499–505.
  46. Marmulla R, Harder J. Microbial monoterpene transformations—a review. *Front Microbiol* [Internet]. 2014 Jul 15;5(JULY):1–14. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00346/abstract>
  47. Oz M, Lozon Y, Sultan A, Yang K-HS, Galadari S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015 Aug;152:83–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725815000972>
  48. Lucia A, Zerba E, Masuh H. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. *Parasitol Res* [Internet]. 2013 Dec [cited 2014 Oct 6];112(12):4267–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100604>
  49. Quintans-Júnior L, Moreira JCF, Pasquali MAB, Rabie SMS, Pires AS, Schröder R, et al. Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. *ISRN Toxicol* [Internet]. 2013;2013:459530. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3658412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  50. De Cássia da Silveira e Sá R, Andrade LN, de Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Oct 6];18(1):1227–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334570>
  51. Almeida JRGDS, Souza GR, Silva JC, Saraiva SRGDL, Júnior RGDO, Quintans JDSS, et al. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. *Sci World J* [Internet]. 2013;2013:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/808460/>
  52. Turkez H, Aydin E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of  $\alpha$ -pinene. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2013;1–9. Available from: <http://tih.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0748233713498456>
  53. Estevão-Silva CF, Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Grespan R, Nogueira de Melo GA, Baroni S, et al. Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB<sub>4</sub>, and carrageenan. *J Nat Med* [Internet]. 2014 Jul [cited 2014 Oct 6];68(3):567–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789168>

54. Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2014 Sep 10];99(18):8788–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18513954>
55. Lima PR, de Melo TS, Carvalho KMMB, de Oliveira ÍB, Arruda BR, de Castro Brito GA, et al. 1,8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice. *Life Sci* [Internet]. 2013 Jul 10 [cited 2014 Oct 6];92(24-26):1195–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702424>
56. De Santana MF, Guimaraes AG, Chaves DO, Silva JC, Bonjardim LR, Lucca Junior W de, et al. The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. *Pharm Biol. England*; 2015 Nov;53(11):1583–90.
57. Grespan R, Paludo M, Lemos H de P, Barbosa CP, Bersani-Amado CA, Dalalio MM de O, et al. Anti-arthritic Effect of Eugenol on Collagen-Induced Arthritis Experimental Model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012. p. 1818–20.
58. Yoon W, Lee NH, Hyun C. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J Oleo Sci*. 2010;59(8):415–21.
59. Lotfi P, Yaghmaei P, Ebrahim-Habibi A. Cymene and Metformin treatment effect on biochemical parameters of male NMRI mice fed with high fat diet. *J Diabetes Metab Disord* [Internet]. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*; 2015 Dec;14(1):52. Available from: <http://www.jdmdonline.com/content/14/1/52>
60. Selvaraj M, Pandurangan A, Seshadri KS, Sinha PK, Krishnasamy V, Lal KB. Comparison of mesoporous Al-MCM-41 molecular sieves in the production of p-cymene for isopropylation of toluene. *J Mol Catal A Chem*. 2002;186(1-2):173–86.
61. Dutta TK, Chakraborty J, Roy M, Ghosal D, Khara P, Gunsalus IC. Cloning and characterization of a p-cymene monooxygenase from *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. *Res Microbiol* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010 Dec [cited 2014 Oct 6];161(10):876–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035544>
62. Xie G, Chen N, Soromou LW, Liu F, Xiong Y, Wu Q, et al. p-Cymene protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting inflammatory cell activation. *Molecules* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Oct 6];17(7):8159–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772811>
63. De Oliveira TM, de Carvalho RBF, da Costa IHF, de Oliveira GAL, de Souza AA, de Lima SG, et al. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharm Biol. England*; 2015 Mar;53(3):423–8.
64. Quintans JDSS, Menezes PP, Santos MRV, Bonjardim LR, Almeida JRGS, Gelain DP, et al. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β-cyclodextrin. *Phytomedicine* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2013 Mar 15 [cited 2014 Oct 6];20(5):436–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357360>

65. Kummer R, Estevão-silva CF, Bastos RL, Silva-comar FMDS, Spironello RA, Rocha BA, et al. Effect of p -cymene on chemotaxis , phagocytosis and leukocyte behaviors. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2015;8(2):20–7.
66. Zhong W, Chi G, Jiang L, Soromou LW, Chen N, Huo M, et al. p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF-κB activation. *Inflammation* [Internet]. 2012 Jun [cited 2014 Sep 29];36(3):529–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207717>
67. Nam S-Y, Chung C-K, Seo J-H, Rah S-Y, Kim H-M, Jeong H-J. The therapeutic efficacy of α-pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Sep 19 [cited 2014 Oct 2];23(1):273–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242385>
68. Bae G-S, Park K-C, Choi SB, Jo I-J, Choi M-O, Hong S-H, et al. Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulein-induced acute pancreatitis. *Life Sci* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Oct 29 [cited 2014 Oct 6];91(17-18):866–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982349>
69. Da Silva ACR, Lopes PM, de Azevedo MMB, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α-pinene and β-pinene enantiomers. *Molecules* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Oct 6];17(6):6305–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442885>
70. Dhar P, Chan P, Cohen DT, Khawam F, Gibbons S, Snyder-Leiby T, et al. Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure-activity relationship of α-pinene derivatives. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2014 Apr 23;62(16):3548–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24716724>
71. Rufino AT, Ribeiro M, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cavaleiro C, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)-α-pinene: Structural and enantiomeric selectivity. *J Nat Prod*. 2014;77(2):264–9.
72. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 Jun;1830(6):3670–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
73. Siani AC, Ramos MFS, Menezes-De-Lima O, Ribeiro-Dos-Santos R, Fernandez-Ferreira E, Soares ROA, et al. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(1):57–69.
74. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar Typhi in vitro and on ready-to-eat food. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Oct 6];74(3):520–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208367>
75. Santana MF, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SCH, Oliveira MGB, Guimarães AG, Cunha ES, et al. P-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Brazilian J Pharmacogn*. 2011;21(6):1138–43.
76. Silva MTM, Ribeiro FPRA, Medeiros MAMB, Sampaio PA, Silva YMS, Silva MTA, et al. The Vasorelaxant Effect of p -Cymene in Rat Aorta Involves Potassium Channels. *Sci World J* [Internet]. 2015;2015:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/458080/>

77. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec;65(1-2):55–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>
78. Lorke. D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol*. 1983;54(4):275–87.
79. BOYDEN S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1962;115:453–66.
80. Ritter AM V, Domiciano TP, Verri W a, Zarpelon AC, da Silva LG, Barbosa CP, et al. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Oct 8];21(2):187–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23054333>
81. Hayes a. J, Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. *Food Chem Toxicol*. 2003;41(10):1409–16.
82. Sinha S, Jothiramajayam M, Ghosh M, Mukherjee A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Jun;68:71–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.036>
83. Kim D, Haynes CL. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *Analyst* [Internet]. 2013 Nov 21 [cited 2014 Oct 6];138(22):6826–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24061073>
84. Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:3–10.
85. Silva-Comar FM de S, Wiirzler LAM, Silva-Filho SE, Kummer R, Pedroso RB, Spironello RA, et al. Effect of Estragole on Leukocyte Behavior and Phagocytic Activity of Macrophages. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2014;2014:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/784689/>
86. Alencar NMN, Oliveira RSB, Figueiredo JG, Cavalcante IJM, Matos MP V, Cunha FQ, et al. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflamm Res* [Internet]. 2010 Apr [cited 2014 Oct 6];59(4):245–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19757085>
87. Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydr Polym* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2014;105:97–112. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.067>
88. Chen L, Zhao L, Zhang C, Lan Z. Protective effect of p-cymene on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Sep 29];37(2):358–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24085645>
89. Napimoga MH, Vieira SM, Dal-Secco D, Freitas A, Souto FO, Mestriner FL, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. *J Immunol*. 2008;

90. Longhi-Balbinot DT, Lanznaster D, Baggio CH, Silva MD, Cabrera CH, Facundo V a, et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012 Jun 26 [cited 2014 Sep 30];142(1):59–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575213>
91. Dal Secco D, Moreira AP, Freitas A, Silva JS, Rossi M a, Ferreira SH, et al. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* [Internet]. 2006 Aug [cited 2014 Oct 6];15(1):77–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621629>
92. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Sep 23];49(9):1618–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338884>
93. Bullone M, Moran K, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. PI3K and MAPKs regulate neutrophil migration toward the airways in heaves. *J Vet Intern Med* [Internet]. 2013;27(1):164–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194017>
94. Verri W a, Souto FO, Vieira SM, Almeida SCL, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Sep 12];69(9):1697–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472598>
95. Suárez Y, Wang C, Manes TD, Pober JS. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2014 Sep 22];184(1):21–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. UNITED STATES*; 1995 Jul;9(10):899–909.
97. Popi AF, Osgui L, Perez KR, Longo-Maugéri IM, Mariano M. Could a B-1 cell derived phagocyte “be one” of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Oct 6];7(3):e34570. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3316698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
98. Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Oct 2];11:2509–29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3253544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
99. Murray PJ, Wynn T a. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Nov [cited 2014 Jul 10];11(11):723–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3422549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
100. Cheng X-Q, Li H, Yue X-L, Xie J-Y, Zhang Y-Y, Di H-Y, et al. Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharides from the roots of *Bupleurum smithii* var.

- parvifolium. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2010 Jul 20 [cited 2014 Oct 6];130(2):363–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546871>
101. Serafino A, Sinibaldi Vallebona P, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, et al. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Oct 6];9:17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2374764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  102. Dai S, Rajaram MVS, Curry HM, Leander R, Schlesinger LS. Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3-mediates phagocytosis and immune suppression for *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Oct 6];9(1):e1003114. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3554622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  103. Chen Y-J, Hsieh M-Y, Chang MY, Chen H-C, Jan M-S, Maa M-C, et al. Eps8 protein facilitates phagocytosis by increasing TLR4-MyD88 protein interaction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 May 25 [cited 2014 Oct 6];287(22):18806–19. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3365777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  104. Tamassia N, Cassatella MA, Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol Biol. United States*; 2014;1124:451–67.
  105. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int immunopharmacol* [Internet]. The Authors; 2013 Dec [cited 2014 Oct 6];17(4):1185–97. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576913004189>
  106. Ji H, Li X, Zhang H. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Rep*. 2009;
  107. Katiyar C, Kanjilal S, Gupta A, Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *AYU (An Int Q J Res Ayurveda)*. 2012;33:10.
  108. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2014 Jan;2014:651593. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4058161&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  109. Abad Martínez MJ, Del Olmo LMB, Ticona LA, Benito PB. The *Artemisia L.* genus: A review of bioactive sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2012. p. 43–65.
  110. Gechev TS, Hille J, Woerdenbag HJ, Benina M, Mehterov N, Toneva V, et al. Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications. *Biotechnol Adv* [Internet]. The Authors; 2014 Mar 26 [cited 2014 Aug 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681091>
  111. Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J Food Sci*. 2014;79(7):1231–49.

112. Takayama C, De-Faria FM, De Almeida ACA, Valim-Araújo DDAEO, Rehen CS, Dunder RJ, et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011;135(1):147–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.002>
113. Quintão NLM, Da Silva GF, Antonialli CS, Rocha LW, Filho VC, Cicció JF. Chemical composition and evaluation of the anti-hypernociceptive effect of the essential oil extracted from the leaves of *Ugni myricoides* on inflammatory and neuropathic models of pain in mice. *Planta Med.* 2010;76(13):1411–8.
114. Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2014 Dec;62(16):250–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014005196>
115. Pick R, Brechtefeld D, Walzog B. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;55(1):70–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.12.008>
116. Nourshargh S, Alon R. Review Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;41(5):694–707. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
117. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* England; 2007 Sep;7(9):678–89.
118. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007;
119. Crossley LJ. Neutrophil activation by fMLP regulates FOXO ( forkhead ) transcription factors by multiple pathways , one of which includes the binding of FOXO to the survival factor Mcl-1. *J Leukoc Biol Leukoc Biol.* 2003;74(October):583–92.
120. Fujita T, Zawawi KH, Kurihara H, Van Dyke TE. CD38 cleavage in fMLP- and IL-8-induced chemotaxis is dependent on p38 MAP kinase but independent of p44/42 MAP kinase. *Cell Signal.* England; 2005 Feb;17(2):167–75.
121. Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: The leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2003;69:123–34.
122. Toda A, Yokomizo T, Shimizu T. Leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 2002 Aug;68-69:575–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090698002000564>
123. Cuzzocrea S, Sautebin L, De Sarro G, Costantino G, Rombolà L, Mazzon E, et al. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Immunol.* 1999;163(9):5094–104.
124. Omote K, Hazama K, Kawamata T, Kawamata M, Nakayaka Y, Toriyabe M, et al. Peripheral nitric oxide in carrageenan-incuded inflammation. *Brain Res.* 2001;912:171–5.
125. Neves A, Rosa S, Gonçalves J, Rufino A, Judas F, Salgueiro L, et al. Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced Nf-kappaB activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of alpha-

pinene. *Planta Med* [Internet]. 2010 Feb [cited 2014 Oct 6];76(3):303–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19774507>

126. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, et al. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur J Pharmacol*. Netherlands; 2001 Nov;431(1):91–102.
127. Parfiniewicz B, Pendzich J, Gruchlik A, Hollek A, Weglarz L. Impact of celecoxib on soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble e-cadherin concentrations in human colon cancer cell line cultures exposed to phytic acid and TNF-alpha. *Acta Pol Pharm*. Poland; 2012;69(6):1283–90.
128. Da Silva Guerra ASH, Do Nascimento Malta DJ, Morais Laranjeira LP, Souza Maia MB, Cavalcanti Colaço N, Do Carmo Alves De Lima M, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(2011):1816–22.
129. Zhou J, Tang F, Mao G, Bian R. Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(4):480–4.
130. Brasier AR. The nuclear factor-B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010;86:211–8.