

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**POTENCIAL IMUNOMODULADOR E ANTIMICROBIANO  
DO (+)- $\alpha$ -PINENO E (+)- $\beta$ -PINENO**

**Davi Felipe Neves Costa**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

**2017**

**DAVI FELIPE NEVES COSTA**

**POTENCIAL IMUNOMODULADOR E ANTIMICROBIANO  
DO (+)- $\alpha$ -PINENO E (+)- $\beta$ -PINENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Co – Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

João Pessoa

2017

Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação

C838p

Costa, Davi Felipe Neves.

Potencial imunomodulador e antimicrobiano do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno / Davi Felipe Neves Costa. - João Pessoa, 2017.

53 f. : il.

Orientador: Lúcio Roberto Cançado Castellano.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Odontologia. 2. Enantiômeros - Potencial imunomodulador. 3. Citotoxicidade. I. Título.

UFPB/BC

DAVI FELIPE NEVES COSTA

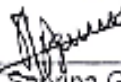
POTENCIAL IMUNOMODULADOR E ANTIMICROBIANO DO (+)-A-  
PIPENÓ E (+)-B-PIPENÓ

Banca Examinadora



---

Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano  
Orientador



---

Profa. Dra. Sabrina Garcia de Aquino  
Examinador - PPGO



---

Profa. Dra. Maria Cristina Tavares de Medeiros Honorato  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

A Deus, meus pais, irmãos, minha esposa e meu filho por todo amor e incentivo que me dão forças para seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar o dom da vida e me abençoar constantemente para conseguir realizar meus sonhos.

Aos meus pais, José Costa e Elzinete Neves, meu porto seguro, sem eles nada disso seria possível. Aos meus irmãos e familiares pelo incentivo e torcida pelo meu sucesso.

A minha esposa Monalisa pela cumplicidade, carinho e paciência dedicado e ao meu filho Arthur que é onde busco forças para continuar esta caminhada.

Aos professores do programa de mestrado em Odontologia da UFPB, pela experiência e ensinamento passados. Em especial ao Prof. Lúcio, Prof. Ricardo e Prof.<sup>a</sup> Sabrina que com suas experiências me ajudaram a desenvolver a pesquisa e dar esse passo para o meu crescimento profissional.

Aos colegas do mestrado, pelo companheirismo durante essa jornada.

Aos colegas de trabalho e residentes do HULW-UFPB pelo suporte, apoio e incentivo. Em especial aqueles que foram voluntários da pesquisa.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para realização deste trabalho, direta ou indiretamente. Certamente não construímos nada sozinhos. Muito obrigado.

*“Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar  
as velas do barco para chegar onde quer.”*

Confúcio

## RESUMO

Os pinenos, constituintes de vários óleos essenciais, têm despertado interesse da comunidade científica pelo potencial anti-inflamatório e antimicrobiano. O presente trabalho avaliou o potencial imunomodulador dos enantiômeros (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno em leucócitos humanos e sua atividade antimicrobiana sobre as espécies *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que concentrações do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno, iguais ou menores que 900 $\mu$ M e 450 $\mu$ M respectivamente, não foram citotóxicas em células PBMCs e que estes fitoconstituintes inibiram a formação de ROS em células PMNs. Os valores da CIM encontrados do (+)- $\alpha$ -pineno para *S. mutans* e *E. coli* foram 3600 $\mu$ M e 450 $\mu$ M, respectivamente, enquanto que para (+)- $\beta$ -pineno foram 1800 $\mu$ M e 225 $\mu$ M. Concluiu-se que os compostos testados possuem atividade antimicrobiana contra as cepas testadas e inibem a produção de ROS.

**Palavras-Chaves:** Pinenos, Imunomodulação, Citotoxicidade, Leucócitos, Antimicrobiano.

## ABSTRACT

Pinenes, constituents of several essential oils, have roused interest of the scientific community, for the anti-inflammatory and antimicrobial potential. The present study evaluated the immunomodulatory potential of (+) -  $\alpha$ -pinene and (+) -  $\beta$ -pinene enantiomers in human leukocytes and their antimicrobial activity on *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli* species. The results showed that concentrations of (+) -  $\alpha$ -pinene and (+) -  $\beta$ -pinene, equal to or less than 900 $\mu$ M and 450 $\mu$ M respectively, were not cytotoxic in PBMCs cells and that these phytochemicals inhibited the formation of ROS in PMN cells. The MIC values of (+) -  $\alpha$ -pinene for *S. mutans* and *E. coli* were 3600 $\mu$ M and 450 $\mu$ M respectively whereas for (+) -  $\beta$ -pinene were 1800 $\mu$ M and 225 $\mu$ M. It is concluded that the compounds tested have antimicrobial activity against the tested strains and inhibit ROS production.

**Keywords:** Pinenes, Immunomodulation, Cytotoxicity, Leukocytes, Antimicrobial.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIM	Concentração inibitória Mínima
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
HEPES	(N-(2-hidroxietil) <i>piperazina</i> -N'-(2-ácido etanosulfônico)
IL1 $\beta$	Interleucina-1beta
IFN $\gamma$	Interferon gama
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL6	Interleucina 6
IL10	Interleucina 10
IL17	Interleucina 17
ISO	International Standard Organization
<i>MAPK</i>	Sigla do inglês traduzida como Proteína-quinases ativadas por mitógenos
NFK $\beta$	Sigla do inglês traduzida como <i>Factor nuclear kappa <math>\beta</math></i>
<i>MRSA</i> metecilina	Sigla do inglês traduzida como <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metecilina
NO	Óxido nítrico
nm	Nanômetro
OMS	Organização mundial de Saúde
PBMC periférico	Sigla do inglês traduzido como célula mononuclear do sangue periférico

PHA	fitohemaglutinina A
PMN	Sigla do inglês traduzida como célula polimorfonuclear do sangue periférico
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Micro-litro
PBS	Sigla do inglês traduzida como Tampão fosfato-salino
TGF $\beta$ 1	Sigla do inglês traduzida como Fator de transformação do crescimento beta1
TNF $\alpha$	Sigla do inglês traduzida como Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1	IMUNOLOGIA.....	4
2.2	FITOTERAPIA.....	7
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	9
2.4	PINENOS.....	12
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	15
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	19
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	19
4.3	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	19
4.4	ESTÍMULOS.....	20
4.5	AMOSTRAS .....	20
4.6	ISOLAMENTO DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	20
4.7	CITOTOXICIDADE.....	20
4.8	DOSAGEM DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
4.9	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	21

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>5 RESULTADO.....</b>	<b>23</b>
5.1 CITOTOXICIDADE.....	23
5.2 DOSAGEM DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	25
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
<b>9 APÊNDICE.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os tecidos orais são frequentemente acometidos por processos inflamatórios decorrentes de infecções, entre os quais, gengivite, periodontite, cárie dentária e abscessos dentais. Além disso, úlceras, afta e mucosite são lesões comumente encontradas na mucosa oral de pacientes com algum tipo de deficiência da imunidade, como por exemplo, aqueles submetidos ao tratamento quimioterápico. (NEVILLE et al., 2009).

Muitas dessas doenças necessitam ser tratadas com medicamentos com potencial antisséptico, anti-inflamatório e/ou antibiótico. Em alguns casos, estes agentes químicos apresentam eficácia reduzida e/ou efeitos adversos, como náuseas, vômitos e alergias limitando o seu uso. (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Múltiplas modalidades terapêuticas foram testadas e utilizadas no decorrer do tempo com finalidade de combater ou reduzir a microbiota patogênica bucal e que possua efeito anti-inflamatório. Resultados satisfatórios são encontrados com o uso da clorexidina, o mais eficiente agente usado de maneira tópica no controle de infecções na cavidade oral. Contudo, esta não possui ação anti-inflamatória associada, além de apresentar alguns efeitos colaterais como pigmentação extrínseca nos dentes e dorso da língua, descamação da mucosa, sensibilidade oral e reações alérgicas (GJERMO et al., 2000; LOUREIRO et al., 2004).

Nesse contexto, os produtos de origem natural surgem como possível alternativa no tratamento dessas afecções. As plantas são usadas desde os primórdios da medicina e sua utilização é fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações. Os fitoterápicos são reconhecidos oficialmente pela Organização Mundial de Saúde – OMS desde 1978. Nessa ocasião a instituição expressou sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito da saúde pública. Os países em desenvolvimento se destacam nesse contexto, já que possuem 67% das espécies vegetais do mundo. O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento dessa terapêutica, sendo considerado um dos países com maior biodiversidade vegetal. (SILVEIRA et al., 2008; BAKKALI et al., 2008; SOUZA et al., 2007; EDRIS, 2007; BRASIL, 2006).

Nesse contexto, os óleos essenciais obtidos de produtos vegetais ganham destaque, considerando sua diversidade de atividades biológicas. Estes são uma mistura complexa de substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas (EDRIS, 2007; VITTI E BRITO, 2003; BAKKALI et al., 2008), com reconhecidas propriedades medicinais, a exemplo de ações analgésica, sedativa e espasmolítica (BAKKALI et al., 2008). Além disso, também foram descritas na literatura outras propriedades farmacológicas, como por exemplo, ação anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (SILVA et al., 2012; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; EDRIS, 2007).

Os pinenos são uns dos constituintes químicos identificados nos óleos essenciais. Eles têm despertado interesse da comunidade científica, por ter mostrado potencial anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano (NAM et al., 2014; SILVA et al., 2012; MATSUO et al., 2011). São encontrados mais comumente nas coníferas, *Eucalyptus* (Eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (árvores de Alecrim) e *Lavandula officinalis* (Lavanda) e, em alguns casos, correspondem ao constituinte majoritário dos óleos extraídos dessas plantas, representando o marcador químico (KIM et al. 2015; BAKKALI et al., 2008).

Os pinenos possuem dois isômeros constitucionais ativos:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno. Ambos os compostos têm enantiômeros conhecidos na natureza. Estudos prévios avaliaram atividades biológicas dessas moléculas. Silva et al (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano da forma positiva e negativa do  $\alpha$  e  $\beta$  pineno e observaram que apenas o (+)- $\alpha$ -pineno e o (+)- $\beta$ -pineno tiveram atividade contra os patógenos testados, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Outros autores que testaram os enantiômeros do  $\alpha$ -pineno foram Dhar et al (2014) e de maneira semelhante verificaram que apenas (+)- $\alpha$ -pineno mostrou ação antimicrobiana sobre espécies de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

Além do efeito antimicrobiano, os pinenos têm apresentado potencial imunomodulador, como mostra o trabalho de Kim et al., (2015). Os autores investigaram o efeito inibitório do  $\alpha$ -pineno na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) usando macrófagos murinos, sendo observada redução

significativa da produção de interleucina-6 (IL6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO).

Apesar do crescente interesse nesse composto, existem poucos estudos relatando as atividades biológicas dos pinenos, sendo necessários mais testes para ampliar conhecimento sobre sua atividade antimicrobiana e o efeito imunomodulador, visando possíveis apresentações farmacêuticas, com segurança e eficácia, que possam se tornar uma alternativa ou complemento no tratamento das patologias orais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial imunomodulador e o efeito antimicrobiano do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Sistema Imunológico**

Quando o ser humano entra em contato com determinados agentes estranhos, tais como vírus, bactérias, fungos e parasitas, desencadeia-se uma sucessão de eventos programados para responder rapidamente, no sentido de eliminar esses agentes. As primeiras barreiras contra esses microrganismos são as barreiras físicas e químicas. Se o agente conseguir superá-las, o organismo dispõe de células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) e células natural Killer na tentativa de conter a infecção. Ainda podem entrar em ação moléculas circulantes (anticorpos e complemento) e mediadores solúveis produzidos pela ativação das células (citocinas). Essa defesa inicial, que já existe em nível basal antes do estabelecimento de uma infecção, é conhecida como resposta imune inata (VAZ et al., 2007).

Geralmente, a invasão de um agente estranho a um tecido provoca uma resposta inflamatória local, que muitas vezes leva ao recrutamento e ativação de leucócitos para o tecido afetado. Os neutrófilos, também denominados de fagócitos polimorfonucleares, representam a população mais numerosa das células sanguíneas brancas circulantes e medeiam as fases mais iniciais das respostas inflamatórias. São as primeiras células a serem recrutadas para locais de infecção após a entrada de um agente estranho (ABBAS et al., 2012).

No sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de eliminar muitos patógenos por meio da fagocitose, a qual pode ser efetivada pela participação ou não de proteínas opsonizantes e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), potentes agentes oxidantes. A imunidade inata pode usar uma variedade de mecanismos efetores para eliminar ou conter uma infecção. No entanto, em caso de falha destes mecanismos, será acionado o sistema imune adaptativo (SOMMER et al., 2010).

A imunidade adaptativa é ativada pelo contato com agentes infecciosos e sua resposta à infecção aumenta em magnitude a cada exposição sucessiva ao mesmo invasor. Esse agente, alvo da resposta imune específica é chamado de antígeno. As células responsáveis pelo reconhecimento de um antígeno são os linfócitos T e B. Estas células são produzidas na medula óssea. Os linfócitos B também se diferenciam na medula, enquanto que os linfócitos T se diferenciam no timo. Estes órgãos são chamados de órgãos linfoides primários. As células NK também são células linfoides, mas tem ação citotóxica independente do reconhecimento específico do antígeno. Após a diferenciação nos órgãos linfoides primários, os linfócitos circulam e povoam os órgãos linfoides secundários, como linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer (VAZ et al., 2007).

Duas populações funcionalmente diferentes podem ser distinguidas entre os linfócitos T. Essa diferenciação se dá pela presença na superfície das moléculas CD4 ou CD8. Assim, a maioria das células que expressa CD4 tem ação auxiliar na resposta imune por meio da produção de citocinas, e as células que expressam CD8 tem ação citolítica, ou seja, são capazes de destruir células que carreguem na superfície peptídeos que elas reconheçam como estranhos. A resposta resultante da ativação de linfócitos T CD4+ ou CD8+ é conhecida como imunidade celular, enquanto a resultante da ativação de Linfócitos B é conhecida como imunidade humoral e é mediada por imunoglobulinas. (VAZ et al., 2007).

A imunidade celular atua quando microrganismos intracelulares, como os vírus e algumas bactérias, sobrevivem e proliferam dentro das células hospedeiras. Estando inacessíveis para os anticorpos circulantes, as células T promovem a destruição do microrganismo ou a morte das células infectadas, para eliminar a infecção (ABBAS et al., 2012).

Os linfócitos T CD4+ ativados secretam citocinas que promovem o crescimento, diferenciação e funções de linfócitos B, macrófagos e outras células. As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa

forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. (SOMMER et al., 2010)

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL, numerada sequencialmente de IL-1 a IL-35, fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal). (SOMMER et al., 2010)

Os linfócitos T podem ser divididos em dois subgrupos definidos pelo tipo de citocinas que secretam: Th1 (*T helper 1*) e Th2 (*T helper 2*). O padrão de diferenciação desses subgrupos é definido por diferentes estímulos, como as citocinas presentes durante sua ativação. A citocina que induz a diferenciação em Th1 é a IL-12 e a citocina que induz a diferenciação em Th2 é a IL-4. (ABBAS et al., 2012)

Algumas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatórias, de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF. As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (SOMMER et al., 2010).

As células Th1 produzem citocinas relacionadas principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, como Interferon-gama (INF- $\gamma$ ), IL-2 e TNF- $\alpha$ . As Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos e helmintos. Após a ativação destas duas subpopulações, Th1 e Th2 influenciam-se mutuamente e de forma antagônica. O INF- $\gamma$  produzido pelas Th1 inibe as Th2, e a IL-10 produzida pelas Th2 inibe as Th1 (VAZ et al., 2007).

O termo imunomodulação pode ser definido como uma modificação da resposta imunológica ou da função do sistema imune, através da ação de agentes estimulantes ou supressores. As células envolvidas na respostas imune possuem função reguladora que podem claramente promover ou suprimir as respostas imunológicas. Esse mecanismo regulador assegura que as respostas sejam apropriadas tanto qualitativamente quanto quantitativamente, mostrando que o próprio sistema imune se autorregula através da liberação de substâncias imunomoduladoras (LOPES, 2004).

Os imunomoduladores podem aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro (imunoestimulantes) ou diminuí-los (imunossupressores). Os imunoestimulantes estimulam os mecanismos que envolvem tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa, através da ativação de células e mediadores, enquanto os imunossupressores agem seletivamente sobre os mecanismos envolvidos na imunidade adaptativa. Dentre os imunomoduladores, destacam-se os produtos de origem vegetal, que vêm despertando interesse da comunidade científica (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

## **2.2 Fitoterapia**

Desde a antiguidade, as plantas fazem parte da vida do homem como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, utensílios para manifestações artísticas, culturais, religiosas e no tratamento de doenças (FONTES, 2014; VITTI & BRITO, 2003).

A utilização de vegetais com fins terapêuticos, visando tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das formas mais comuns de praticar Medicina na humanidade. Existem indícios do uso de plantas medicinais na época dos homens primitivos que, ao procurar plantas para seu sustento, foram descobrindo espécies com ação tóxica ou medicinal, dando início a uma sistematização empírica pelos seres vivos, de acordo com o uso que podia fazer destas plantas, uma tradição que foi sendo transmitida e incorporada ao longo de gerações até os dias atuais (VEIGA & PINTO, 2005; SIMÕES *et al.*, 2003).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas Farmacopeias da época. Assim, as plantas e seus extratos constituíam a maioria dos medicamentos que pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (SIMÕES *et al.*, 2003).

A história do uso de produtos naturais na Medicina é apresentada no quadro 1. É possível verificar que o uso de plantas medicinais é antigo.

Quadro 1: **História dos produtos naturais com finalidade medicinal**

<b>Período</b>	<b>Descrição</b>
Antes de 3000 a.C.	Medicina ayurvédica (conhecimento da vida) e Medicina tradicional chinesa: introduziu propriedades medicinais de plantas e outros produtos naturais
1500 a.C	Ebers Papytus: Apresentou um grande número de fármacos de fontes naturais( exemplo: goma arábica).
460-377 a.C	Hipócrates (“pai da Medicina”): Descreveu várias plantas e animais que poderiam ser fontes de medicamentos
370-287 a.C.	Teofrasto (médico grego): Descreveu várias plantas e animais que poderiam ser fontes de medicamentos
23-79 d.C	Pliny the Elder: Descreveu plantas que poderiam ser utilizadas de forma medicinal
60- 80 d.C	Pedáneo Dioscórides: Escreveu <i>De matéria Medica</i> que descrevia mais de 600 plantas medicinais.
131-200 d.C.	Galeno: Medicina botânica (Galênica) e a difundiu no ocidente.
Século XV d.C	Krauterbuch (Herbais): Apresentou informações e pinturas de plantas medicinais

Fonte: Sarker *et al.* (2005)

Atualmente as plantas têm representado uma fonte valiosa de produtos para manutenção da saúde humana, havendo um aumento no interesse por produtos naturais, especialmente nos últimos anos. Segundo a OMS, as plantas medicinais são as melhores fontes para se obter uma variedade de drogas e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Além disso, a seleção de plantas a partir de informações da medicina tradicional ou popular pode conduzir à descoberta de moléculas promissoras (SANTOS *et al.*, 2007).

No Brasil a utilização das plantas medicinais é observada desde o período colonial, onde produtos de origem natural eram empregados no controle de diversas enfermidades. A utilização de plantas no país para o tratamento de doenças apresenta fundamental influência de culturas indígenas, africana e europeias. Em meados do século XVIII as propriedades dessas plantas foram estudadas e divulgadas no mundo científico, contribuindo para o início da construção de uma ampla rede de informações a respeito das possíveis aplicações das plantas na Medicina do Brasil (ARAÚJO, 2017; BORGES *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a flora brasileira tem despertado a atenção mundial devido à sua biodiversidade. Plantas de biomas brasileiros, tais como floresta amazônica, mata atlântica, cerrado e caatinga, têm sido utilizadas pelas populações locais como produtos naturais com potencial para o tratamento de várias doenças tropicais, como esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ARAÚJO, 2017).

O surgimento do conceito de “natural” contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Este termo passa a ideia de “ausência de produtos químicos”, ou seja, produtos que podem estar relacionado com algum prejuízo à saúde. Assim, esses produtos ditos naturais passaram a ser sinônimos de produtos saudáveis e benéficos. No entanto, esse conceito é equivocado, pois sabe-se que as plantas podem ser fornecedoras de agentes químicos tóxicos para células humanas (FONTES, 2014).

O conceito de plantas medicinais, segundo a OMS, compreende “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser

utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semissintéticos” (ARAÚJO, 2017, p37). A agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) descreve os fitoterápicos como todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais e relata que estes necessitam ser caracterizados quanto à eficácia e riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etno-farmacológicos de utilização e documentações tecno-científicas produzidas a partir de estudos clínicos e não clínicos (BRASIL, 2004).

Os fitoterápicos, portanto, têm grande potencial de se tornar uma alternativa de tratamento de diversas doenças. Na Odontologia, algumas espécies são amplamente empregadas, como cravo da Índia, romã, amoreira, camomila, entre outras, que são utilizadas empiricamente em casos de gengivite, abscesso e aftas. No entanto, é importante que sejam feitos estudos científicos para amparar tal uso na Odontologia. Assim faz-se necessário o direcionamento de pesquisas na área culminando com o desenvolvimento de fitoterápicos de qualidade e validados para uso na Odontologia (OLIVEIRA, et al., 2007).

### **2.3 Óleos Essenciais**

Dentre os agentes terapêuticos provenientes de plantas com uso medicinal popular e científico, observa-se uma tendência à busca de fitoconstituintes a partir de extratos, frações ou óleos essenciais. Dentre esses compostos, os óleos essenciais assumem uma posição de destaque. (BAKKALI et al., 2008). A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (COSTA et al., 2012).

Historicamente, os óleos essenciais e os extratos de plantas têm servido de base para diversas aplicações na Medicina popular. A destilação como método de produção foi usada inicialmente no Oriente há mais de 2000 anos, sendo aperfeiçoada pelos árabes no século IX. Na Europa, seu uso só foi disseminado a partir do século XVI. A primeira medida experimental de suas propriedades

antibacterianas foi empreendida por De la Croix, em 1881. Entretanto, no decorrer dos séculos XIX e XX, seu interesse terapêutico para este fim diminuiu, diante de sua aplicação como aromatizante e como perfume. Nos dias atuais, seu principal uso na comunidade europeia é baseado nas indústrias alimentícias (aromatizantes), de perfumes e farmacêuticas (BURT, 2004).

Óleos essenciais são uma mistura complexa de substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismo. São substâncias líquidas, incolores, voláteis, lipofílicas e normalmente com aroma agradável. São conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências e são extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, sementes, brotos, galhos, casca de caule, frutos e raízes (EDRIS, 2007; VITTI & BRITO, 2003; BAKKALI *et al.*, 2008).

Os mais variados constituintes químicos podem ser identificados nos óleos essenciais, entre eles: álcoois simples, aldeídos, cetonas, destacando-se a presença de hidrocarbonetos terpênicos. No entanto, a maioria é uma mistura de derivados (VITTI E BRITO, 2003; SILVA ET AL., 2012). Os constituintes podem se apresentar em alta concentração, denominados componentes principais, ou em baixíssimas concentrações, sendo conhecidos como componentes traços (VITTI E BRITO, 2003).

A composição dos óleos essenciais é determinada geneticamente, mas as condições ambientais e fisiológicas como temperatura e exposição à luz, são capazes de causar variações importantes nesta composição (VITTI E BRITO, 2003; RAMOS *et al.*, 2005). Além dessas variações, a composição também depende da parte da planta que é submetida à destilação (raiz, madeira, casca, folha, caule, flor, semente) fatores agronômicos como fertilização, irrigação, colheita e especialmente a fase de desenvolvimento da planta na data da colheita também influenciam no conteúdo dos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008).

Conhecidos por suas propriedades medicinais e sua fragrância, os óleos essenciais são usados para preservação de alimentos, como analgésicos, sedativos e espasmolítico (BAKKALI *et al.*, 2008). Além disso, já foram descritas na literatura várias aplicações farmacológicas, como no tratamento do câncer, por

quimioprevenção e supressão tumoral; em doenças cardiovasculares, no tratamento da arteriosclerose e na prevenção de acidentes tromboembólicos; no combate a microrganismos como bactérias, vírus e fungos; como antioxidante, como hipoglicemiantes, sendo excelentes adjuvantes no combate à diabetes; como anti-inflamatórios e como veículos para drogas de uso transdérmico (EDRIS, 2007; SILVA et al., 2012; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

## **2.4 Pinenos**

Os pinenos são substâncias constituintes de vários óleos essenciais e, em alguns casos, correspondem ao constituinte majoritário dos mesmos. Esses fitoconstituintes têm despertado interesse da comunidade científica por terem mostrado potencial efeito anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano (MATSUO et al., 2011; SILVA et al., 2012; NAM et al., 2014). São muito comuns na região nordeste do Brasil em plantas como a *Plectranthus barbatus* (Malva-Santa) que, na Medicina popular, são usadas no tratamento de distúrbios intestinais e respiratórios (BAKKALI et al., 2008; KIM et al. 2015).

Fazem parte da família dos terpenos, substâncias químicas encontradas como constituintes de muitos extratos vegetais. Na natureza, representam uma das maiores e mais diversas classes de metabólitos secundários, com aproximadamente 55.000 membros isolados até hoje. São formados pela ciclização enzimática através da conversão de moléculas simples, lineares de hidrocarbonetos fosfatados em esqueleto carbocíclicos quirais. Oxidação e rearranjos posteriores fornecem um interminável número de estruturas químicas concebíveis. Por isso, ocupam lugar especial na história das ciências químicas e, por consequência, na Medicina, por possuírem um largo espectro de ações farmacológicas, desde atividades anticâncer à capacidade de interferência em canais iônicos (JUCÁ, 2007).

Possuem ampla distribuição e são encontrados, por exemplo, nas plantas superiores, fungos, organismos marinhos e feromônios de insetos. São também chamados isoprenóides, pois sua estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Os monoterpenos, dos quais os pinenos fazem parte, são composto por duas unidades de isopreno (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>), os sesquiterpenos por três (C<sub>30</sub>H<sub>64</sub>), os diterpenos por quatro (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>), os triterpenos compostos por seis

(C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>) e os tetraterpenos, ou caratenóides, tem oito unidades de isopreno (C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>). (ROBBERS, 1997).

Os pinenos possuem dois isômeros constitucionais ativos:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno. Ambos os compostos têm enantiômeros conhecidos na natureza. Enantiômeros são tipos de isômeros que ocorrem em moléculas quirais, ou seja, em moléculas cuja imagem não é sobreponível, como mostra a figura 1. Estas possuem uma série de propriedades físicas e químicas iguais, tais como os pontos de fusão e ebulição e densidade. Entretanto, diferenciam-se em propriedade de rotação específica, quando um dos enantiômeros desvia a luz para esquerda e o outro para direita. A mistura racêmica, ou seja, a forma positiva e negativa juntas também pode ser encontrada na natureza, como no óleo extraído do *Eucalyptus*, podem estar em igual proporção, ou em excesso de uma de suas formas. (SILVA *et al.*, 2012; SOLOMONS; FRYHLE 2009).

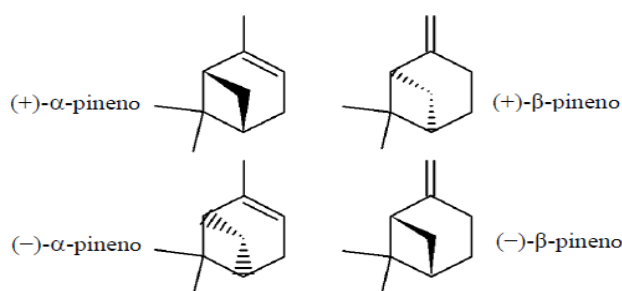


Figura 1: Estrutura química dos enantiômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno

Fonte: SILVA, 2012

A ocorrência de enantiômeros pode levar a características específicas. O limoneno, por exemplo, tem como uma de suas formas enantioméricas a principal responsável pelo odor das laranjas [(+) limoneno], enquanto a outra forma é a responsável pelo odor dos limões [(-) limoneno]. Outro caso muito conhecido, e até polêmico é sobre a talidomida, medicamento usado para aliviar enjoos de mulheres grávidas, que foi usado por muitos anos, até que se descobriu que a forma dextrógira (giro da luz polarizada para direita) do medicamento era a única

que poderia ser eficiente, enquanto que o outro enantiômero foi o responsável por várias anomalias em recém-nascidos. (OLIVEIRA, 2011).

Kim *et al.* (2015) investigaram o efeito inibitório do  $\alpha$ -pineno na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo usando macrófagos de peritônio de ratos. O  $\alpha$ -pineno reduziu significativamente a produção de interleucina-6, TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (NO). Além disso, atenuaram a ativação da Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e do factor nuclear kappa  $\beta$  (NFK  $\beta$ ).

O estudo *in vivo* de Nam *et al.* (2014) também destacou o efeito imunomodulador dos pinenos. Os autores avaliaram o efeito do  $\alpha$ -pineno em modelo de rinite alérgica. Animais foram sensibilizados com ovalbumina e foi avaliado o efeito do uso oral do  $\alpha$ -pineno no processo inflamatório. Os resultados mostraram que houve diminuição dos sintomas clínicos, do nível de imunoglobulina E (IgE) e TNF- $\alpha$ , além da redução da infiltração de mastócitos e eosinófilos no tecido da mucosa nasal.

Li *et al.* (2016) também avaliaram *in vivo* o potencial anti-inflamatório do  $\alpha$ -pineno. Os autores avaliaram o óleo de incenso, obtido da *Boswellia carterii*, que possui como fitoconstituintes, além do  $\alpha$ -pineno, linalol, e 1-octanol. As atividades anti-inflamatórias e analgésicas deste óleo e de seus fitoconstituintes foram comparadas, com extrato aquoso. Os autores induziram processo inflamatório com xileno em orelha de ratos e formalina em suas patas traseiras para depois avaliar infiltrado inflamatório e a expressão da cicloxigenase 2 em cortes histológicos. Os achados desse estudo mostraram que os ratos tratados com óleo de incenso ou seus fitoconstituintes exibiram efeitos anti-inflamatórios e analgésicos significativamente superiores ao extrato de água, apresentando diminuição mais rápida do inchaço e da dor.

O enantiômero (+)- $\alpha$ -pineno também mostrou efeitos anti-inflamatórios em condrócitos humanos, revelando-se promissor como uma nova droga com potencial no tratamento da osteoartrite, o que pode ser interessante no tratamento de doenças generativas da articulação temporomandibular (ATM). Na pesquisa de Rufino *et al.* (2014), além do enantiômero (+), os autores avaliaram também (-)- $\alpha$ -Pineno que se mostrou menos efetivo que a forma positiva e enantiômero (+)- $\beta$ -

pineno que foi inativo na modulação da inflamação nos condrócitos. Os autores constataram que (+) -  $\alpha$ -pineno inibiu a produção de interleucina-1 $\beta$ , NFK  $\beta$ , *c-Jun N-terminal kinase*, NO e metaloproteinase de matriz sendo promissor no tratamento de doenças degenerativas das articulações.

## **2.5 Atividade Antimicrobiana**

As bactérias são responsáveis por centenas de doenças, algumas bem comuns como faringite, otites e cáries. Habitualmente, as infecções podem ser localizadas, limitada a uma pequena área, como uma ferida infectada e um abscesso dentário, que exigem um tratamento simples assistido em ambiente ambulatorial ou podem disseminar e apresentar risco à vida, necessitando de internação hospitalar e cuidados de alta complexidade, como é o caso de algumas infecções de origens dentárias. As infecções odontogênicas, como dito, são comuns e têm origem nos dentes e no periodonto, sendo na sua maioria de natureza polimicrobiana. (TOPAZIAN *et al.*, 2006)

Os antibióticos são ferramentas importantes no controle dessas doenças infecciosas, inibindo ou eliminando essas bactérias. Dependendo das suas características, cada grupo de bactérias (Gram-positivas ou Gram-negativas) é usualmente susceptível a apenas um grupo limitado de antimicrobianos e apresenta resistência inerente à ação de outros (TOPAZIAN *et al.*, 2006).

A resistência das bactérias a antibióticos é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa, por exemplo, tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública. Nesse contexto, devido ao número de microrganismos que se tornam resistentes aos múltiplos antimicrobianos disponíveis está aumentando, o desafio para o tratamento de doenças e infecções torna-se premente, juntamente à necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas a serem utilizadas no combate a esses micro-organismos (ARAÚJO, 2017; BURT, 2004).

Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais têm ganhado importância. As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em óleos essenciais, especialmente os terpenos, têm despertado interesse de pesquisadores. Dois mecanismos foram propostos até o momento para explicar a ação dos terpenos na membrana celular: essas moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo proteína, ou ainda, pode haver uma interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas de membranas (BURT, 2004).

Entre os compostos da família dos terpenos, os isômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, têm despertado interesse pelo seu potencial antimicrobiano, que vem sendo investigado desde a década de 60 (OH *et al.* 1967). Desde então algumas centenas de artigos já foram publicados envolvendo esses monoterpenos e sua atividade antimicrobiana. Uns desses autores foram Martins *et al.* (2003) que realizaram testes para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial da casca de *Santiria trimera* e de seus principais fitoconstituintes,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, em concentrações de 66% e 20% respectivamente. Os autores encontraram que o óleo essencial e os pinenos foram significativamente eficazes contra cepas de *Escheria coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

Bernardes *et al.* (2010) também avaliaram o potencial antimicrobiano dos pinenos. Os autores analisaram o óleo essencial de *Rosmarinus Offcinalis* e seus principais constituintes, entre eles o  $\alpha$ -pineno, contra patógenos orais. Foi usada a técnica de microdiluição para encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) contra as seguintes cepas bacterianas responsáveis pelo processo de cárie: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados mostraram que  $\alpha$ -pineno apresentou atividade antibacteriana contra todos os micro-organismos testados.

O potencial antimicrobiano dos pinenos também foi avaliado no estudo de Leite *et al.* (2007). Os autores avaliaram a capacidade do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno de inibir o crescimento de bactérias potencialmente causadoras de endocardite

utilizando a técnica de microdiluição. Os fitoconstituintes apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas das bactérias gram-positivas testadas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e de *Streptococcus pyogenes*.

Já Silva *et al.* (2012) avaliaram os enantiômeros positivos e negativos com a técnica de microdiluição em caldo e constataram que apenas os enantiômeros (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno tiveram efetividade contra alguns patógenos, entre eles cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Os pinenos inibiram o crescimento das cepas testadas e tiveram efeito sinérgico quando associado à ciprofloxacino contra cepas de MRSA.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade imunomoduladora e atividade antimicrobiana do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar potencial citotóxico do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno em células mononucleares do sangue periférico (PBMC);
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico expostos ao (+)- $\alpha$ -Pineno e (+)- $\beta$ -pineno
- Avaliar o potencial antimicrobiano do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno contra cepas *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo experimental, de natureza laboratorial e caráter *ex vivo*.

### **4.2 Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Número: 1.869.951

Os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para doação de sangue, de acordo com a resolução 466/2012, no que se refere às questões de ética em pesquisa com seres humanos.

### **4.3 Critérios de elegibilidade**

#### ***Critérios de inclusão***

- Voluntários com idade de 18 a 40 anos saudáveis que expressaram formalmente o desejo de participarem do estudo através do TCLE

#### ***Critérios de exclusão***

- Alérgicos a quaisquer tipos de substâncias utilizadas;
- Tabagistas e etilistas;
- Pacientes com discrasias sanguíneas, imunodeficiências e neoplasias malignas;
- Voluntários com histórico de doenças crônicas (como asma e diabetes), infectocontagiosas (hepatite, AIDS, entre outras), alérgicas ou inflamatórias.

#### **4.4 Fitoconstituintes usados como estímulos**

(+)- $\alpha$ -pineno  $\geq 99\%$  obtido no laboratório Sigma lote MKBV1042V

(+)- $\beta$ -pineno PA obtidos no laboratório Sigma lote BCBK2147V

#### **4.5 Amostras**

Foram coletados 9 ml de sangue periférico de três voluntários por punção venosa a vácuo com frascos plásticos heparinizados estéreis da linha Vacutainer (Becton Dickinson) e isolados os PMNS E PBMCS.

Para os ensaios antimicrobianos foram usadas cepas *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*.

#### **4.6 Isolamento das células mononucleares (PBMCS) e polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico**

Os PBMCS e PMNs foram isolados pelo protocolo de duplo gradiente de Ficoll-Paque™ 1077 e 1119 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) de acordo com Leelatian *et al.* (2015). Brevemente, após centrifugação a 700g e 20°C por 30 minutos do sangue com Ficoll nas duas densidades, as camadas leucocitárias foram coletadas e postas em tubos falcon de 15 ml seguido por três lavagens com tampão de fosfato (PBS) com centrifugação a 200g por 10 minutos. Para as células PMNs foi utilizado tampão de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.8%) por três minutos antes da segunda lavagem com PBS. A quantificação do número de células viáveis foi realizada pelo método de exclusão do azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich®) utilizando a câmara de Neubauer em contador de células eletrônico (Countess II FL- Life Technologies). As células foram suspensas em meio RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino (5%), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) e 1mM HEPES.

#### **4.7 Citotoxicidade**

A citotoxicidade foi realizado com alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  dos PBMCS a  $2 \times 10^6$  células/ml com adição de 1 $\mu\text{l/ml}$  de Phytohemagglutinin A (PHA) em placas de 96 poços pretas (Greiner Bio-One, EUA) incubados com 50  $\mu\text{l}$  dos estímulos de (+)- $\alpha$ -pineno e do (+)- $\beta$ -pineno em diferentes concentrações (112,5 $\mu\text{M}$ ; 225  $\mu\text{M}$  450 $\mu\text{M}$ ; 900 $\mu\text{M}$ ; 1800 $\mu\text{M}$ ; 3600 $\mu\text{M}$  e 7200 $\mu\text{M}$ ) em duplicata e durante 24 horas a

37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O controle de morte celular foi realizado com etanol absoluto, e no controle de viabilidade foi apenas células. Após o período, adicionou-se 10 µL de solução de resazurina de acordo com o protocolo alamarBlue® (Bio-Rad, Hercules, EUA). A placa foi lida no leitor de fluorescência de microplacas após 10 horas usando filtros específicos para o desejado comprimento de onda (GloMax multi, Promega, EUA).

#### **4.8 Dosagem de estresse oxidativo**

O estresse oxidativo foi mensurado pela liberação de ROS, analisado por quimiluminescência com adição de luminol. Foram adicionados alíquotas de 30 µL de células PMNs a 2x10<sup>5</sup> células/ml e 30µL das amostras de (+)-α-pineno e do (+)-β-pineno (nas concentrações pré-determinadas que não foram tóxicas) em placas brancas de poliestireno de 96 poços (Greiner Bio-One, EUA). As células com as amostras foram incubadas por 45 minutos a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação foi adicionado 180µL de luminol 10<sup>-4</sup> M (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Foram realizados ensaios com e sem adição do estímulo Zimosan soro-opsonizado (13mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os controles positivos e negativos foram as células com adição Zimosan soro-opsonizado ou apenas meio respectivamente. A quimiluminescência foi medida em intervalos de dois minutos com um luminômetro GloMax®-Multi leitor de placa (Promega, Madison, EUA) por um período de 1h em 37°C. A quimiluminescência foi expressa como unidades de luz relativa (RLU) e a área sob a curva (AUC) foi determinada para cada estímulo.

#### **4.9 Atividade antimicrobiana**

A determinação da CIM do (+)-α-pineno e (+)-β-pineno sobre cepas de *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* foi realizada através da técnica da microdiluição descrito pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2005). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo BHI nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, foram distribuídos 100 µL das substâncias em cada poço, que foram diluídas seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL do poço mais concentrado para a cavidade sucessora. Em seguida foram adicionadas alíquotas de 100 µL do inóculo correspondente a cada cepa ensaiada (5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL).

Paralelamente, foi realizado o controle da viabilidade da cepa (controle de crescimento) e o controle de esterilidade do meio. Como controle positivo foi utilizado a Clorexidina a 2%. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas de microdiluição foram incubadas em estufa por 48h a 37°C. A leitura para determinação da CIM dos pinenos foi feita pelo método visual, levando-se em consideração a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo dos poços. Dessa forma, a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento dos microrganismos utilizados no ensaio. Para confirmação da presença de microrganismos viáveis ou não nas concentrações inibitórias foi utilizado o corante resazurina no volume de 10 µL.

Para a determinação da CBM, a CIM e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIMx2 e CIMx4), bem como o controle positivo foram subcultivados em placas de ágar BHI a 37°C/24h, sendo considerada CBM a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo.

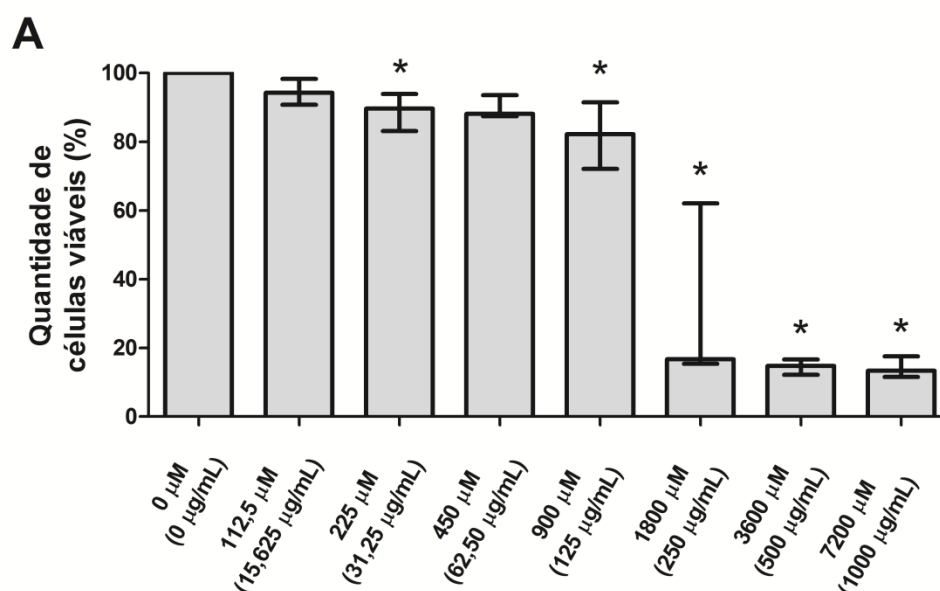
#### **4.10 Análise estatística**

Para avaliar a viabilidade de células PBMCs incubadas com (+)- $\alpha$ -pineno e do (+)- $\beta$ -pineno foram aplicados os testes de *Kruskal-Wallis*, seguido do método de *Dunn*. Na dosagem do estresse oxidativo em células PMNs foi usado o teste *One-way analysis of variance* e depois Teste de comparações múltiplas de Tukey. O objetivo da análise foi avaliar o efeito do estímulo com os enantiômeros (+)- $\alpha$ -pineno e do (+)- $\beta$ -pineno na citotoxicidade e na produção de ROS. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ( $p=0.05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Citotoxicidade dos (+)- $\alpha$ pineno e (+)- $\beta$ -pineno

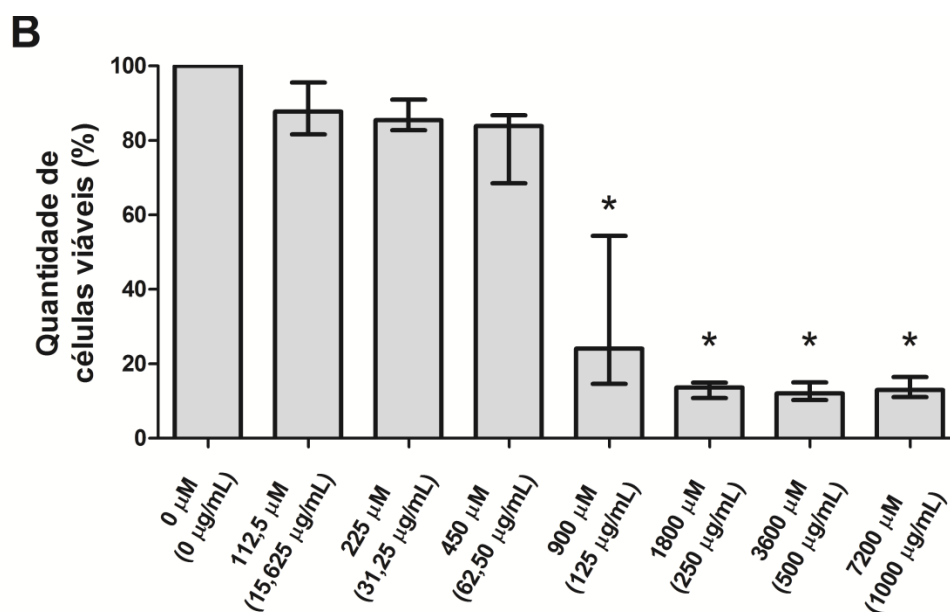
Na figura 2, estão registrados os valores dos testes de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os resultados mostram que concentrações de (+)- $\alpha$  pineno, iguais ou maiores que 1800 $\mu$ M (250 $\mu$ g/ml) foram tóxicas, com altas taxas de mortalidade e viabilidade celular abaixo de 20%, indicando diferença estatisticamente significativa em relação ao controle de viabilidade (células sem estímulo). As concentrações entre 112,5  $\mu$ M (15,62 $\mu$ g/ml) e 900  $\mu$ M (125 $\mu$ g/ml) foram citocompatíveis exibindo viabilidade celular acima de 80%.



**Figura 2. Porcentagem de células viáveis após estímulo com (+)- $\alpha$ -pineno.** PBMCs foram cultivadas na ausência ou presença de concentrações variando de 0  $\mu$ g/ml a 7200  $\mu$ M (1000  $\mu$ g/ml) de (+)- $\alpha$ -pineno. \* $p < 0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*, seguido de Teste de múltiplas comparações de *Dunn*) indicando diferença significativa em relação ao controle sem estímulo.

Os resultados da citotoxicidade do (+)- $\beta$ -pineno estão representados na figura 3. O gráfico mostra que concentrações iguais ou maiores que 900 $\mu$ M

(125µg/ml) foram demasiadamente tóxicas, com viabilidade celular próxima dos 20%. Estes valores apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. As concentrações entre 112,5 µM (15,62µg/ml) e 450 µM (62,5µg/ml) não foram tóxicas nas células testadas, revelando viabilidade celular acima de 80%.

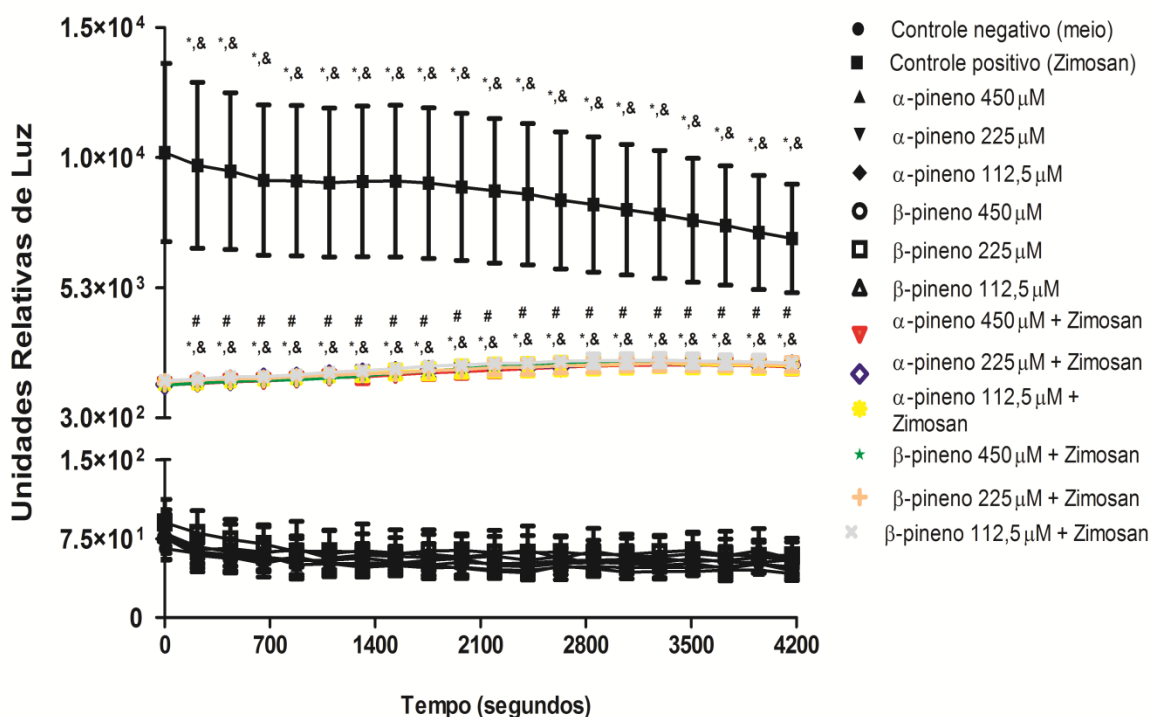


**Figura 3. Porcentagem de células viáveis após incubação com (+)-β-pineno.** PBMCs foram cultivadas na ausência ou presença de concentrações variando de 0 µg/ml a 7200 µM (1000 µg/ml) de (+)-β-pineno. \* $p < 0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*, seguido de Teste de múltiplas comparações de *Dunn*) indicando diferença significativa em relação ao controle sem estímulo (0 µM).

## 5.2 Liberação de espécies reativas de Oxigênio (ROS)

Foram eleitos para esse teste apenas concentrações de (+)-α pineno e (+)-β-pineno que não foram tóxicas: entre 112,5 µM (15,62µg/ml) e 450 µM (62,5µg/ml). A produção de espécies reativas de oxigênio pelas células PMNs foi estimulada com Zimosan soro-opsonizado. Ambos os fitoconstituintes não induziram a produção de ROS em células polimorfonucleares nas concentrações testadas quando comparadas com o controle positivo (células com estímulos), as três concentrações dos enantiômeros positivos dos pinenos inibiram a produção de

ROS ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle positivo conforme demonstrado na figura 4.



**Figura 4. Produção de espécies reativas de oxigênio por PMN estimulados com (+)- $\alpha$ -pineno e (B) (+)- $\beta$ -pineno.** Células polimorfonucleares de sangue periférico humano (PMN) foram cultivadas na ausência ou presença de concentrações variando de 112,5  $\mu$ M (15,62 $\mu$ g/ml) a 450  $\mu$ M (62,5 $\mu$ g/ml) de (+)- $\alpha$ -pineno e (B) (+)- $\beta$ -pineno, na presença ou ausência de 10 $\mu$ l de Zimosan. A produção de ROS foi quantificada em unidades relativas de luz (RLU) a partir da reação do ensaio em presença de 180 $\mu$ l de luminol. Aplicado o teste de análise de variância *One-way*, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, onde: \*  $p < 0,05$  indicando diferença significativa em relação ao controle negativo (meio). &  $p < 0,05$  indicando diferença significativa em relação aos estímulos alfa e beta pineno sozinhos. #  $p < 0,05$  indicando diferença significativa em relação ao Zimosan.

### 5.3 Atividade Antimicrobiana

Na tabela 1 estão registrados os valores da CIM, a CBM e a razão CIM/CBM dos fitoconstituintes em estudo. Observou-se que (+)- $\alpha$  pineno na concentração de 450  $\mu$ M (62,5 $\mu$ g/ml) inibiu o crescimento da cepa de *E. coli* e com a mesma concentração teve efeito bactericida. Este composto precisou de concentrações

maiores para se encontrar a CIM contra cepas de *S. mutans*, 3600  $\mu\text{M}$  (500 $\mu\text{g/ml}$ ), o valor de CBM foi igual a CIM. A razão CIM/CBM sugere atividade bactericida contra as duas cepas testadas.

Ainda de acordo com a tabela 1, o (+)- $\beta$ -pineno foi mais efetivo contra as cepas testadas quando comparados com (+)- $\alpha$ -pineno. Os resultados da CIM contra as bactérias *E. coli* e *S. mutans* foram 225  $\mu\text{M}$  (31,2 $\mu\text{g/ml}$ ) e 1800  $\mu\text{M}$  (250 $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente. O enantiômero positivo do  $\beta$ -pineno também apresentou atividade bactericida quando avaliada a razão CIM/CBM.

**Tabela 1: Atividade antimicrobiana do (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno sobre cepas de *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração bactericida Mínima (CBM) foram expressos em  $\mu\text{M}$  e ( $\mu\text{g/ml}$ ). \* Valores < 4 significa atividade bactericida,  $\geq 4$  bacteriostático.

Cepa	Substância	CIM $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	CBM $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	CBM/CIM*	Atividade antimicrobiana
<i>Streptococcus mutans</i>	(+)- $\alpha$ -pineno	3600 (500)	3600 (500)	1	Bactericida
	(+)- $\beta$ -pineno	1800 (250)	3600 (500)	2	Bactericida
<i>Escherichia coli</i>	(+)- $\alpha$ -pineno	450 (62,5)	450 (62,5)	1	Bactericida
	(+)- $\beta$ -pineno	225 (31,2)	225 (31,2)	1	Bactericida

## 6 DISCUSSÃO

As propriedades biológicas dos pinenos e suas possíveis indicações como agente antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante, aliados ao conhecimento da toxicidade desses compostos, conferem uma margem de segurança na utilização dos mesmos como fitomedicamentos. A avaliação da toxicidade de qualquer substância a ser utilizada como medicamento é passo fundamental para uso seguro na saúde humana. Para isto é necessário realizar testes de citotoxicidade, pois, apesar de serem substâncias naturais, elas podem ser tóxicas. Assim, é importante definir as concentrações que apresentam toxicidade elevada e as que permitem a viabilidade celular (FERREIRA & NARDI, 2015).

O estudo da citotoxicidade deve contemplar diferentes formas de exposição da substância testada e pode ser feita em vários tipos de células. O estudo da citotoxicidade dos pinenos já foi realizado em macrófagos peritoneais de ratos, hemácias, mastócitos e condrócitos humanos (RUFINO et al., 2014; NAM et al., 2014; KIM et al., 2015; SILVA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015; JUCÁ, 2007). O presente estudo avaliou a toxicidade celular em PBMCs de sangue periférico humano.

Silva et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade dos enantiômeros (+)- $\alpha$  e (+)- $\beta$ -pineno em macrófagos peritoneais de ratos. As concentrações usadas (62,5  $\mu\text{g/ml}$  e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) foram semelhantes às utilizadas neste trabalho. Os autores encontraram que concentrações iguais ou maiores que 62,5  $\mu\text{g/ml}$  do (+)- $\alpha$ -pineno e 125  $\mu\text{g/ml}$  do (+)- $\beta$ -pineno apresentaram toxicidade elevada. Na presente pesquisa foram encontrados os mesmos resultados nos testes com (+)- $\beta$ -pineno enquanto que (+)- $\alpha$ -pineno foi menos citotóxico, apresentando alta taxa de mortalidade em concentrações a partir de 250  $\mu\text{g/ml}$ .

Kim et al. (2015) também fizeram testes de viabilidade celular com fitoconstituintes. Os autores usaram macrófagos murinos estimulados com baixas concentrações do  $\alpha$ -pineno (entre 0,2 e 20  $\mu\text{M}$ ) e como esperado, por se tratar de baixas concentrações, as substâncias não foram tóxicas e apresentaram uma viabilidade celular de 100%. No presente estudo foi avaliado o enantiômero (+)- $\alpha$ -pineno em um intervalo maior de concentrações. A viabilidade celular próxima dos 100% foi encontrada em concentrações iguais ou menores que 112,5  $\mu\text{M}$ .

O fitoconstituente majoritário do óleo *Syzygium cumini* (Brinco-de-viúva) é o  $\alpha$ -pineno. A citotoxicidade dessa substância foi avaliada por Rodrigues et al. (2015) em macrófagos murino e hemácias humana. O fitoconstituente  $\alpha$ -pineno foi tóxico para 50% dos macrófagos e das hemácias, nas respectivas concentrações, 2975 $\mu$ M e 1631 $\mu$ M. No presente estudo as células testadas foram as PBMCs de sangue periférico e foi avaliado o enantiômero positivo do  $\alpha$ -pineno que apresentou toxicidade elevada em concentrações a partir de 1800 $\mu$ M, semelhante aos valores encontrados em hemácias humanas.

No estudo de Gostner et al. (2014) o teste de citotoxicidade também foi realizado em células PBMCs. Os autores avaliaram o óleo de *Lavandula angustifolia* (lavanda) e isolaram (+)- $\alpha$ -pineno, um dos constituintes majoritários desse óleo essencial. A concentração do pineno que foi tóxica para 50% das células foi de 195 $\mu$ M. Já no presente estudo com (+)- $\alpha$ -pineno, foram encontrado resultados divergentes. As concentrações 225 $\mu$ M, próximas da testada por Gostner et al. (2014) não foram tóxicas, e apenas valores de 1800  $\mu$ M tiveram toxicidade elevada, concentração quase 10 vezes maior que a encontrada pelos autores do estudo citado.

Algumas divergências na literatura foram encontradas em relação à concentração tóxica dos pinenos. Possivelmente os achados se devem às diferentes células testadas e porque em alguns trabalhos foram usadas a mistura dos enantiômeros e como descrito, apesar terem propriedades físicas e químicas idênticas, as propriedades biológicas podem ser diferentes. No presente trabalho, e na maioria das pesquisas consultadas, (RODRIGUES et al., 2015; GOSTNER et al., 2014) concentrações iguais ou menores que 450  $\mu$ M, tanto para o (+)- $\alpha$ -pineno como para (+)- $\beta$ -pineno, obtiveram viabilidade celular aceitável. Por esse motivo, as concentrações eleitas para serem utilizadas nos testes de imunomodulação foram entre 112,5, 225 e 450  $\mu$ M.

A produção excessiva de ROS ou a falha endógena do sistema imune em inibir sua formação pode ocasionar um distúrbio no equilíbrio antioxidante e, conseqüentemente, uma situação de estresse oxidativo, causando oxidação indiscriminada de moléculas biológicas, peroxidação lipídica, distúrbio

mitocondrial, carbonilação de proteínas e rupturas e danos da cadeia de DNA (PORRES-MARTINEZ, 2015).

Os níveis de ROS intracelular nas células U373-MG tratadas com  $\alpha$ -pineno foram testados no estudo de Porres-Martinez et al. (2015). Foram encontrados resultados semelhantes ao deste estudo, pois, os pinenos não induziram a produção de ROS em comparação com os controles. Os autores do referido estudo usaram peróxido de hidrogênio para estimular a produção de ROS, e encontraram que as células tratadas previamente com  $\alpha$ -pineno diminuíram entre 30 a 45% a produção de ROS em concentrações entre 10 a 25  $\mu$ M. No presente estudo, a substância utilizada para estimular foi o zimosan e também houve redução dos níveis de ROS quando tratadas com moléculas de (+)- $\alpha$ - pineno e (+)- $\beta$ -pineno nas concentrações entre 112,5 a 450  $\mu$ M.

Em outro estudo foi avaliada a produção ROS usando o 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfato) (ABTS) no óleo essencial extraído de *Ferula assafoetida* e de seus principais fitoconstituintes isolados, entre eles  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno. O óleo essencial testado foi eficaz em inibir a produção do ROS, no entanto, as concentrações testadas dos pinenos não mostraram nenhuma atividade na diminuição de ROS (KAVOOSI et al., 2013). No presente estudo foram realizados testes com células PMNs estimuladas com Zimosan e foi observado que os enantiômeros (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno (entre 112,5 e 450  $\mu$ M) foram eficazes em inibir a produção de ROS.

A interação do  $\alpha$ -pineno na produção de ROS foi avaliada em um estudo realizado com células de hamster chinês realizado por CATANZARO et al. (2012). Foi observado que este composto induziu a produção de ROS nas concentrações testadas (25 a 50  $\mu$ M), com aumento dos níveis com maiores concentrações. O presente estudo difere do trabalho citado, visto que, tanto (+)- $\alpha$ -pineno quanto (+)- $\beta$ -pineno nas concentrações testadas (112,5 a 450  $\mu$ M) não induziu a produção ROS em células PBMCs quando comparado com o controle positivo e inibiu a produção quando induzidas por Zimosan. O uso de células diferentes pode ser um dos prováveis motivos para os resultados divergentes.

Não foram encontrados trabalhos que avaliaram a produção de ROS do  $\beta$ -pineno ou dos enantiômeros dos pinenos, apenas testes com a mistura dos enantiômeros do  $\alpha$ -pineno e, mesmo assim, com metodologia diferente, haja vista que não foram usados leucócitos do sangue periférico estimulados com zimosan. Os resultados do presente estudo mostraram que (+)- $\alpha$ -pineno (+)- $\beta$ -pineno nas concentrações testadas (112,5 a 450  $\mu$ M) não possuem propriedades pró-inflamatórias e apresentaram atividade anti-inflamatória em relação à produção de ROS.

Em relação à atividade antimicrobiana desses terpenos, ainda permanecem mal compreendidos os mecanismos específicos envolvidos no mecanismo de ação. No entanto, é possível que as moléculas de hidrocarbonetos cíclicos se acumulem na bicamada lipídica da membrana e ocorrendo uma interação lipídeo proteína, ou ainda, pode haver uma interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas causando a lise da membrana citoplasmática (RAJPUT, 2013; BURT, 2004).

Nesse contexto, alguns estudos avaliaram a atividade antimicrobiana do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno isolados de óleos essenciais contra cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* (CUTILLAS et al., 2017; COTÉ et al., 2017). Nesses estudos,  $\beta$ -pineno não apresentou atividade contra as cepas testadas nas concentrações entre 200 e 2000 $\mu$ g/ml. No estudo Coté et al. (2017),  $\alpha$ -pineno também não apresentou atividade bacteriana, no entanto, no trabalho de Cutillas et al (2017) o valor da CIM contra *E. coli* foi 500 $\mu$ g/ml e contra *S. aureus* 2100 $\mu$ g/ml. No presente estudo, o (+)- $\alpha$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno se mostraram significativamente mais efetivos e os valores da CIM contra as cepas *E. coli* foram 31,25  $\mu$ g/ml e 62,5  $\mu$ g/ml respectivamente. Uma possível explicação para os resultados divergentes em relação aos de Coté et al. (2017), é o tipo de metodologia usada, que foi um ensaio hidrofóbico, diferente da técnica de microdiluição usada neste trabalho e por Cutillas et al. (2017).

Em estudos prévios, o efeito antimicrobiano dos pinenos isolados de óleos essenciais foi avaliado contra os patógenos orais. As seguintes cepas foram testadas: *E. faecalis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis* (BERNARDES et al., 2010; CREVELIN et al., 2015). Os valores da CIM do  $\alpha$ -

pineno encontrados por Bernardes et al. (2010) contra cepas *S. mutans* foi de 14680 $\mu$ M, e para as outras cepas variaram entre 2940 $\mu$ M e 14680 $\mu$ M, exceto para *E. faecalis* que não teve ação. No estudo de Crevelin et al. (2015)  $\alpha$ - pineno e  $\beta$ - pineno isolados foram pouco efetivo. A CIM encontrada para cepas de *S. mitis* e *S. salivarius* foi alta, 29360  $\mu$ M, enquanto que para as outras espécies não apresentaram atividade nas concentrações testadas. No presente estudo o (+)- $\alpha$ - pineno (+)- $\beta$ -pineno se mostraram efetivos contra cepas do *S. mutans*, com valores da CIM entre 1800 $\mu$ M e 3600 $\mu$ M respectivamente. No entanto, esses valores foram considerados citotóxicos no teste de viabilidade celular.

Dhar et al. (2014) realizaram experimentos para avaliar o efeito antimicrobiano dos enantiômeros (+)- $\alpha$ -pineno e (-)- $\alpha$ -pineno e encontraram atividade contra cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus* e *C albicans* apenas na forma positiva. Silva et al (2012) também elegeram os enantiômeros dos pinenos como objeto de pesquisa; os autores também não encontraram atividade antimicrobiana quando realizaram testes com (-)- $\alpha$ -pineno e (-)- $\beta$ -pineno. Apenas os enantiômeros positivos apresentaram atividade contra cepas *S. aureus* metilina resistente, *C albicans*, *C. neoformans* e *R. oryzae*.

À medida que se aprofundam os estudos envolvendo os pinenos, fica evidente a possibilidade desses compostos terem aplicação clínica, inclusive na Odontologia, visto que foi demonstrada sua citocompatibilidade e ações anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. No entanto, outros estudos ainda são necessários, no intuito de melhor elucidar o mecanismo de ação antimicrobiana e imunomoduladora para, posteriormente, instituir um protocolo de utilização seguro e eficaz.

## 7 CONCLUSÃO

Foram encontradas concentrações não tóxicas do (+)- $\alpha$  e (+)- $\beta$ -pineno em células PBMCs. As três menores concentrações testadas dos fitoconstituintes inibiram a formação de ROS sugerindo atividade anti-inflamatória. Os enantiômeros positivos dos isômeros pinenos apresentaram ação antibacteriana frente a cepas de *S. mutans* e *E. coli*, sendo que os menores valores de CIM e de CBM foram observados para *E. coli*.

## 8 REFERÊNCIAS\*

1. ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. H. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
2. ARAÚJO, I. D. R. *Atividade antimicrobiana e citotóxica de óleo essencial e extratos orgânicos provenientes da *Myracrodruon urundeuva* (AROEIRA-DO-SERTÃO)*. [Dissertação]. UFRN, 2017.
3. BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008.
4. BERNARDES W. A. et al. Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Rosmarinusoffi cinalis* and its Major Components against Oral Pathogens. *Z. Naturforsch.* V.65, p. 588 – 593, 2010.
5. BORGES, A. M. et al. La insercion de las plantas medicinales em la practica de la enfermeria: um crescente desafio; *Revista electronica cuatrimestral de enfermeria global*, v.18, 2010.
6. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de Março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
7. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência nacional de vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e Complementares (PNPIC) no sistema único de Saúde. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, poder Executivo*, Brasília, DF, 4 mar. 2006.

\* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of food microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.
9. CASTELLANO, L.R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. *Human Immunology*, v.70, p. 383-390, 2009.
10. CATANZARO, I. et al. Genomic instability induced by  $\alpha$ -pinene in chinese hamster cell line. *Mutagenesis*. v.27, n.4 p 463-469, 2012.
11. COSTA, E. V. et al. Essential oil from the leaves of *Amnnona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Natural product Communications*, vol. 7, p. 265-266, 2012.
12. COTÉ, H. et al. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines*, v.4, p. 34, 2017.
13. CREVELIN, E. J. et al. Antimicrobial activity of Essential oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria. *Evidence-Based Complementari and Alternative Medicine*, v.1, p.6, 2015.
14. CUTILLAS, A. B. et al. Composition and Antioxidant, Antienzymatic and Antimicrobial Activities of Volatile Molecules from Spanish *Salvia lavandulifolia* (Vahl) Essential Oils. *Molecules*, v.22, p.1382, 2017.
15. DHAR, F. et al. Synthesis, Antimicrobial Evaluation, and structure-activity relationship of  $\alpha$ -Pinene Derivates. *J. Agric. Food Chem*, v.62 p. 3548–3552, 2014.
16. EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research* *Phytother. Res*, v.21, p.308–323, 2007.

17. FERREIRA, K.F.C.; NARDI, J. M. Evaluation on In vitro Cytotoxicity of Bauhinia Glabra Extract in normal Lymphocytic Cells. Cad. Da Esc. De Saúde. v.1, n.13, p.79-92, 2015.
18. FONTES, J. E. N. Estudo Fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das folhas de Guatteria Pogonopus MART. (ANNONACEAE). [Dissertação]. Universidade Federal de Sergipe, 2014.
19. GJERMO, P. et al. Relationship between plaque inhibiting effect and retention of chlorohexidine in the human oral cavity, Archives of Oral Biology, v.19, n.11, p. 1031-1034, Nov 2000.
20. GOSTNER J. M. et al. Lavender oil suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human PBMC. BMC Complementary and Alternative Medicine, v.14, p.503, 2014.
21. JUCÁ, D. M. Propriedade farmacológicas dos monoterpenos,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno no músculo liso Gastrintestinal de ratos: Efeitos miorelaxantes e pró-cinético. [Dissertação].Ceará: UFC. 2007.
22. KAVOOSI, G. et al. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities od Essencial oils from *Carum copticum* seed and *Ferula Assafoetida* Latex. Journal of food Science, v.78 p.2, 2013.
23. KIM, D. et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity through the Suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages The American Journal of Chinese Medicine, v.43, n.4, p.731–742, 2015.
24. LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bactéria *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v.43, n.1, p.112-114, jan./mar, 2007.
25. LI, X. et al.  $\alpha$ -Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. Journal of Ethnopharmacology v.179, p.22–26, 2016.

26. LOPES, F. C. M. Avaliação da atividade imunológica in vitro de *Alchornea* spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- $\alpha$  por macrófagos murinos. [Tese]. Campinas: Unesp. 2004.
27. LOUREIRO, C. C. S. et al. Efeitos adversos dos medicamentos tópicos e sistêmicos na mucosa bucal. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v.70, n.1, p.106-111, 2004.
28. MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro: v.79 n.6, p.647-664, nov/dez, 2004.
29. MARTINS, A. P et al. Essential oil composition and Antimicrobial activity of *Santiria trimera* Bark. *Panta med*, v.69 p.77-79, 2003
30. MATSUO, A. L. et al.  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.411, p.449–454, 2011.
31. NAM, S. et al. The therapeutic efficacy of  $\alpha$ -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. *International Immunopharmacology*, v.23, p.273–282, 2014.
32. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod*, v.79, p.629–661, 2016.
33. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v.75, p.31-33, 2012.
34. NEVILLE, B. W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p.972, 2009.
35. NUNES-PINHEIRO, D. C. S. et al. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: Perspectivas em medicina veterinária. *Ciência Animal*, v.13 p.23-32, 2003.

36. OH, H.K.; SAKAI, T.; JONES, M.B. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity, v.4 p.77-84, 1967.
37. OLIVEIRA, F. Q. et al. M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev. Bras. Farmacogn, v.17, n.3, 2007.
38. OLIVEIRA, J. R. Composição e variabilidade enantiomérica de  $\alpha$ -pineno em *Constrictotermes cyphogaster* (Isoptera; Termitidae). [Tese]. UFG. 2011.
39. PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. et al. A.G. The anti-Candida activity of *Thymbra capitata* essential oil: Effect upon pre-formed biofilm. J Ethnopharmacol, v.27, p.379-83, 2012
40. PORRES- MARTÍNEZ, M. et al. Major selected monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole found in *salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. Pharm Biol, p.53, n.6, p.921-929, 2015.
41. RAJPUT, S.B.; KARUPPAYIL, S.M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. SpringerPlus, v.2 p.26, 2013.
42. RAMOS, S. J. et al. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. Revista brasileira de plantas medicinais, v.8, n.1, p.9-12, 2005.
43. ROBBERS, J. E. Farmacognosia e farmacobiotechnologia. São Paulo: Editorial Premier, 1997.
44. RODRIGUES, K. A. F. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. J. Ethnopharmacology v.160, p.32-40, 2015
45. RUFINO, A. T. et al. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- $\alpha$ -pinene: structural and enantiomeric selectivity. J Nat Prod, v.28 p.264-9, 2014.
46. SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Natural product Isolation. Natural product isolation, v. 20, p.1-25, 2005.

47. SANTOS, S. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema Cochilocarpus* (Gomes) Barneby; Grimes. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.17, n.2, 2007
48. SILVA, A. C. R. et al., D.S. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers *Molecules*, v. 17, p.6305-6316, 2012.
49. SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicas: uma realidade. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, p.618-626, 2008.
50. SIMÕES, C. M. O et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5ª Edição. Editora da UFSC, 2003.
51. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. 9ª edição, v.1. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
52. SOMMER, C.; WHITE, F. - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press, v.4, p.279-302, 2010.
53. SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. R. Avaliação da atividade antiséptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringer*(Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.1, n.1, 2007
54. TOPAZIAN RG, GOLDBERG MH, HUPP JR. *Infecções Orais e Maxilofaciais*. Ed. Santos. 4º ed, 2006.
55. VEIGA JR., A. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v.28 p.519-528, 2005.
56. VITTI, A. M. S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de Eucalipto. *Documentos florestais número*, v.17, p.1-26, 2003.
57. VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C.; *Imunoensaios: Fundamentos e aplicações*. RJ: Guanabara Koogan, 2007.

## APÊNDICE

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre a citotoxicidade e imunomodulação do (+)- $\alpha$ -Pineno e (+)- $\beta$ -Pineno em leucócitos humanos e está sendo desenvolvida por Davi Felipe Neves Costa, mestrando em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba, com orientação dos Professores Drs. Lúcio Roberto Cancado Castellano e Ricardo Dias Castro.

A finalidade deste trabalho é contribuir para o esclarecimento acerca dos efeitos do (+)- $\alpha$ -Pineno e (+)- $\beta$ -Pineno sobre as células do sangue humano. Se você concordar em participar deste estudo serão coletadas 1 amostra 12 mililitros de seu sangue a serem submetidos a exames laboratoriais exclusivamente destinado a este estudo. A partir desta amostra serão realizados testes (exames com o sangue) para determinação da toxicidade do (+)- $\alpha$ -Pineno e (+)- $\beta$ -Pineno. Os tubos serão codificados, de modo a garantir sigilo sobre a identidade do participante.

A coleta de sangue através de punções venosas para exames laboratoriais com seringas e agulhas descartáveis e estéreis podem, embora sejam raros, resultarem em dor no local da punção, manchas rochas transitórias chamadas de equimoses, desconforto e a possibilidade de infecção. Em caso de danos decorrentes de sua participação no estudo, haverá assistência integral e gratuita.

Os resultados deste estudo serão apresentados em eventos da área de saúde e publicados em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, será mantido em sigilo sobre os participantes da pesquisa.

A participação no estudo é voluntária e, portanto, não há obrigação de fornecimento de informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo

Pesquisador. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não haverá nenhum dano, nem modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Haverá ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo.

Os pesquisadores estarão à disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor contatar o pesquisador: Lúcio Roberto Cançado Castellano Endereço (Setor de Trabalho): Universidade Federal da Paraíba – Campus I / Cidade Universitária - João Pessoa - PB – Brasil, Telefone (83) 3216-7189 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus I - Cidade Universitária - 1º Andar – CEP 58051-900 – João Pessoa/PB. Telefone: (83) 3216-7791 – E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com.

Dados os devidos esclarecidos e, caso haja consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados, favor assinar no campo a baixo. Uma via desse documento será entregue aos voluntários.

_____	___ / ___ / ___	
Assinatura do Participante	dia    mês    ano	
_____	___ / ___ / ___	
Assinatura de Testemunha, se necessário	dia    mês    ano	

Espaço para impressão  
dactiloscópica

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Responsável

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Participante

Obs.: O sujeito da pesquisa ou seu representante e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do TCLE apondo suas assinaturas na última página do referido Termo.