



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

ISIS OLIVEIRA MENEZES

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO TERPINOLENO: REVISÃO SISTEMÁTICA E
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO MURINO

Crato

2021



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

ISIS OLIVEIRA MENEZES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO TERPINOLENO: REVISÃO SISTEMÁTICA E
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO MURINO**

Relatório de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Coorientadora: Dra. Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins

Crato

2021

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
URCA**

(anexar no verso na folha II, na versão final em capa dura - E-mail biblioteca@urca.br,)

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**

Menezes, Isis Oliveira

Atividades biológicas do terpinoleno: revisão sistemática e efeito anti-inflamatório em modelo murino.

99 páginas

Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional do Cariri
– Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Departamento de
Química Biológica.

1. Palavra-Chave Terpinoleno. Inflamação. Modelo murino. Revisão sistemática. Atividade Antiedematogênica. Universidade Regional do Cariri – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Departamento de Química Biológica.

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site <http://bdt.d.ibict.br/bdt.d/>, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:	<input checked="" type="checkbox"/> Dissertação	<input type="checkbox"/> Tese
Autor: Isis Oliveira Menezes		
CPF: 060.462.713-04	RG: 2005034061101	
Nacionalidade: Brasileira	Estado Civil: Solteira	
Endereço Completo: Rua Amâncio Barbosa de Sousa		
CEP: 63018-080	Cidade: Juazeiro do Norte	Estado: Ceará
Fone/Celular: (88) 997547173	E-mail: isiso.menezes@outlook.com	
Título: Atividades biológicas do terpinoleno: revisão sistemática e efeito anti-inflamatório em modelo murino		
Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes		
Coorientadora: Dra. Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins		
Membros da Banca: Dr. José Galberto Martins da Costa		
Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho		
Dr. Jaime Ribeiro Filho		
Dr. Iri Sandro Pampolha Lima		
Data da Defesa: 29/10/2021	Curso: Programa de Pós-graduação em Química Biológica	
Área do Conhecimento: Farmacologia		
Palavras-Chave: Terpinoleno. Inflamação. Modelo murino. Revisão sistemática. Atividade Antiedematogênica		
3. Agência de Fomento: FUNCAP		
Informações de Acesso ao Documento: para publicação	<input checked="" type="checkbox"/> Acesso Total	<input type="checkbox"/> Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):		

Crato, 28 de dezembro de 2021.

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o (s) arquivo (s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES

Assinatura do Autor: *Isis Oliveira Menezes* Assinatura do Orientador:



ISIS OLIVEIRA MENEZES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO TERPINOLENO: REVISÃO SISTEMÁTICA E
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO MURINO**

Relatório de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica e aprovado em: 29 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes / Orientador

Professor Titular da Universidade Regional do Cariri, URCA.


Dr. José Gilberto Martins da Costa / Membro Titular

Professor Titular da Universidade Regional do Cariri, URCA.


Dr. Jaime Ribeiro Filho / Membro Titular

Professor Titular do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz Bahia (UFBA/FIOCRUZ).


Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho / Membro Suplente

Professor Titular da Universidade Regional do Cariri, URCA.


Dr. Iri Sandro Pampolha Lima / Membro Suplente

Professor Titular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Cariri, UFCA.

Dedico este trabalho a
minha família: minha
motivação e confiança
em todos os momentos.
Amo vocês!

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial e todas as outras forças e energias que guiam meus caminhos diariamente, mostrando beleza em cores, formas, aromas, pensamentos e pessoas, que são presentes constantes na minha vida.

Agradeço a mim, à mulher que venho me tornando, por sempre acreditar e não desistir por mais que a vida diga o contrário. Sou parte de tudo que vi, vivi e convivi. Sou fruto de cada conquista e tropeço, de cada obrigada e cada momento de “não vai dar certo”, mas dá! **Sempre dá!** Obrigada pelas dádivas a mim concedidas na ordem da minha evolução e merecimento. E também peço a Deus e às forças universais que o representam que me conceda: sabedoria, leveza, força e vontade para merecer e conquistar tudo aquilo que eu busque, aproveitando cada momento e recomeçando sempre que for preciso, sem nunca desistir de mim.

Agradeço em especial, aos meus pais Geni Oliveira Lopes e Francisco Moreira de Menezes e meus irmãos Liz Oliveira Menezes e Isaac Oliveira Menezes, pelo apoio incondicional durante a trajetória: vibrando e se desdobrando para que tudo desse certo. Vocês são minha base, meu exemplo, minha inspiração; mostram a força do respeito e complementariedade de pessoas que tanto se amam, com incentivo constante ao crescimento e que não há limite para sonho algum! “Sonhe grande! Sonhar é de graça!”. Dou atenção especial a mamãe, a qual tenho profunda e incalculável admiração. É exemplo de mãe, esposa, amiga, conselheira e mulher forte, imparável que me mostra todos os dias o poder da gentileza. Agradeço o privilégio de vir à Terra para aprender tanto sob seus cuidados.

A meu orientador Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, a quem respeito e agradeço pelo exemplo como pesquisador e professor, por todos os ensinamentos durante a caminhada, oportunidades a mim ofertadas, e pela confiança de permitir fazer parte dessa grande família científica do LFQM, e à minha coorientadora Dra. Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, que sempre demonstra disposição em ouvir, transmitir e colaborar com seu conhecimento.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Química Biológica por quase todo o período ao qual fui mestrande, professor Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho, que sempre me recebeu dizendo com um sorriso largo: “Ôo dona Isis!”, demonstrando alegria, dedicação e disposição para comigo. À secretária do programa, Manuela Fernandes, pela paciência, prontidão e disponibilidade na resolução de situações e urgências. Essa dupla me ajudou muito!

E todos os professores que contribuíram para o desenvolvimento de meus conhecimentos, em especial à Profa. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga pela sua delicadeza como pessoa e disposição de sempre em ajudar e ao prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha, sempre disposto a auxiliar no que fosse preciso bem como por ceder a substância teste utilizada durante o mestrado, sem o senhor, os ensaios experimentais não teriam sido realizados.

Agradeço as pessoas dessa família científica do LFQM que tenho o privilégio de fazer parte: à Andreza Guedes Barbosa Ramos, que me acolheu e instruiu com ensinamentos e confiança desde o meu ingresso no laboratório e tornou-se uma amiga e encorajadora para conversas longas de qualquer assunto que se possa imaginar; à Lucas Yure e Renata Pessoa, os principais responsáveis pelo auxílio na execução de meus testes desde o início do mestrado além de essenciais para manter o bem estar dos camundongos; a Junior Silva e Eduardo dos Santos pela prontidão, auxílio, conversas e carinho de sempre; assim como a Isabel Alcântara, Lindaiane Rodrigues, Melissa Helen, Gabriely de Lima, Tarcísio, Rayane Oliveira, Roger Henrique e Lucas Batista, colaboradores do LFQM, especiais e sábios, que auxiliaram na minha construção acadêmica e pessoal.

Agradeço a banca, que prontamente aceitou prestigiar e contribuir com a defesa, a qual foi composta pelos professores doutores: José Galberto Martins da Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Jaime Ribeiro Filho, Iri Sandro Pampolha Lima que contribuíram amplamente com essa pesquisa, bem como com a minha formação.

À parceria com o prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho (Fundação Oswaldo Cruz Bahia – Fiocruz/BA) e a profa. Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans (Universidade Federal de Sergipe - UFS) pela valiosa contribuição para o mestrado, o trabalho conjunto proporcionou a publicação do nosso artigo de revisão.

Aos animais: agradeço a cada camundongo, pela missão terrena em permitir que a etapa fosse conduzida e realizada da melhor forma possível.

A minhas famílias: “Oliveira” (materna), e “Menezes” (paterna): sempre presentes! A eles tenho profundo orgulho e felicidade de dizer que são exemplos de alegria, perseverança, acolhimento, comunhão, amor, companheirismo e fé, de sempre estar por perto em qualquer momento de sofrimento ou felicidade. Por traduzirem o real significado da palavra FAMÍLIA. Trago aqui, em especial, minha tia, farmacêutica, Tereza Neuma, um exemplo que desde a

graduação se entusiasma e apoia meu crescimento e conhecimento a cada nova etapa que venho trilhando.

A família “Butzen Scherf”: Berta Butzen, Ademir Scherf, Ademir Junior, e, especialmente Jackelyne Roberta Scherf por essa amizade de 14 anos que atravessou ensino fundamental, médio, superior e pós-graduação junto a mim, uma longa amizade recheada de muita história, risada, perrengue companheirismo e apoio mútuo. Até porque... “Uma hora sempre dá certo! ”.

Aos meus amigos-irmãos: Jackelyne Roberta Scherf, Fernanda Cavalcante Novaes, Mackswell Romualdo Gomes Teixeira e Arysa Cabral Barros que adoçaram com acompanhamento extra-acadêmico. Amigos do riso ao choro que tenho o privilégio de partilhar a vida.

A todos que compartilharam de momentos de descontração e sempre acreditaram em mim! Em especial: Victor Juno Alencar Fonseca, Ludmila Cavalcante Liberato, Ana Carla Ribeiro da Silva, Fábio Fernandes Galvão Rodrigues, Yannice Tatiane da Costa Santos, Raissa Cruz Oliveira, Denise Aline Casimiro Bezerra, Maria Anesia Sousa de Alencar, Thiago Sampaio de Freitas, Dimas Luiz Rodrigues Grangeiro, Thaiz Rodrigues Teixeira, Odaias Pereira de Almeida Filho e tantos outros que não teria como citar.

A dança, a espiritualidade, a música, as presenças e a cada sopro de vida que foram a mim: refúgio e aconchego. Essas pequenas grandes coisas estão na minha vida antes mesmo dos primeiros passos e a percorrem em diferentes roupagens: amenizando, transmutando e auxiliando na resignificação de momentos desagradáveis e contemplação até da mais sutil beleza, que permitia não desacreditar na gentileza.

À Universidade Regional do Cariri, que sediou essa fase marcante.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço aos que fazem e lutam pela ciência e a busca por uma vida melhor, cheia de conhecimentos, descobertas e com cada vez menos ignorância. Avante! Temos um caminho longo pela frente!

E por fim, a todos que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse sonho: o meu sincero e respeitoso agradecimento.

“Acorde... Se cubra de
gratidão, se encha de
amor e recomece”

Chico Xavier

Item	Assunto	Página
1	Introdução geral	1
2	Objetivos	4
2.1	Objetivo geral	4
2.2	Objetivos específicos	4
3	Fundamentação teórica	5
3.1	Produtos naturais	6
3.2	Metabólitos secundários: terpenos	7
3.3	Terpinoleno e suas atividades biológicas	10
3.4	Inflamação	11
4	Produção científica	13
4.1	Artigo de revisão aceito	13
4.2	Artigo da atividade anti-inflamatória no formato da revista para a qual será submetido	34
5	Considerações finais	51
5.1	Aspectos gerais da produção científica	51
5.2	Conclusões gerais	53
5.3	Perspectivas de investigações futuras	53
6	Referências	54
7	Anexos e Apêndices	66
	Apêndices	66
Apêndice 1	Metodologia estendida (METHODX)	66
1	Revisão sistemática	66
2	Avaliação anti-inflamatória	68
	Anexos	72

Anexo 1	Parecer do Comitê de Ética	72
Anexo 2	Outros anexos específicos do desenvolvimento de cada trabalho.	73
Anexo 3	Outros anexos de produção científica extra realizados durante o período do mestrado.	75

Título	Página
Figura 1: Organograma geral da dissertação	3
Figura 2: Estrutura química do isopreno	8
Figura 3: Vias de sinalização para biossíntese de metabólitos secundários por meio do metabolismo vegetal	9
Figura 4: Estrutura química do terpinoleno	10
Figura 5: <i>Graphical abstract</i> do artigo de revisão	14
Figure 1: The chemical structure of terpinolene	16
Figure 2: Flowchart detailing literature search according to the PRISMA statement	17
Table 1: <i>In silico</i> terpinolene studies	18
Table 2: <i>In vitro</i> terpinolene studies	19
Table 3: <i>In vivo</i> terpinolene studies	24
Figure 3: (a) Number of publications per year; (b) Geographical distribution of publications are represented of total publications	26
Figure 4: Type of study vs. biological activity	26
Figure 5: Risk of bias summary	27
Figure 6: The risk of bias scale indicates the proportion of articles that met each criterion	27
Figure 7: Predicted molecular targets for terpinolene	28
Figura 1: Efeito do terpinoleno nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL (aplicação tópica) sobre o edema de orelha induzido óleo de cróton em camundongos	40
Figura 2: Efeito do terpinoleno (50, 100 e 200 mg/kg) sobre o tempo de lambadura da pata traseira direita na primeira e segunda fase do teste de formalina	41
Figura 3: Efeito do terpinoleno nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina	41

Figura 4: Efeito do terpinoleno nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre o edema de pata induzido por dextrana	42
Figura 5: Efeito do terpinoleno na dose de 200 mg/kg (v.o.) sobre o edema de pata induzido por histamina	42
Figura 6: Efeito do terpinoleno na dose de 200 mg/kg (v.o.) sobre o edema de pata induzido por ácido araquidônico	43
Figura 7: Efeito do terpinoleno na dose de 200 mg/kg (v.o.) sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E ₂	43
Figura 8: Efeito do terpinoleno na dose de 200 mg/kg sobre a implantação de blocos de algodão. (a) peso de <i>pellets</i> (g) e (b) teor de proteínas totais (mg/dl)	44
Anexo 1 - Parecer da Comissão de ética	72
Anexo 2 - Anexos específicos do desenvolvimento de cada trabalho	73
Anexo 3 - Anexos específicos de produção científica extra realizados durante o período do mestrado	75

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de variância)
CEUA	Comissão de Experimentação e Uso de Animais
CFA	<i>Freund's Complete Adjuvant</i> (Adjuvante Completo de Freud)
COX 2	Cicloxygenase-2
COX	Cicloxygenase
DL ₅₀	Dose Letal mediana
EIM	Efeito inibitório médio
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio (Inglês: ROS - <i>Reactive oxygen species</i>)
IL	Interleucina (família)
iNOs	Óxido nítrico sintase induzível
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LFQM	Laboratório de Farmacologia e Química Molecular
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MIC	<u><i>Minimal Inhibitory Concentration</i></u> (Concentração Inibitória Mínima -CIM)
NF-κB	Fator Nuclear <i>kappa</i> B
ON	Óxido Nítrico (Inglês: NO: <i>Nitric oxide</i>)
ONS	Óxido Nítrico Sintase (família) (Inglês: NOS: <i>Nitric oxide synthesis</i>)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
TNF-α	Do inglês: “Tumor Necrosis Fator” (Fator de Necrose Tumoral)

v.o. Via oral

Atividades biológicas do terpinoleno: revisão sistemática e efeito anti-inflamatório em modelo murino

RESUMO

Introdução: O terpinoleno é um monoterpene lipossolúvel presente em diversas espécies vegetais. Até o momento, estudos de diversas atuações desse terpeno são de quantidade reduzida na literatura científica dificultando o acesso e a compreensão necessários para a evolução da pesquisa e futuro desenvolvimento de novos produtos. **Objetivo:** Elucidar as potencialidades biológicas do terpinoleno, elencando suas bioatividades, bem como, avaliar seu potencial anti-inflamatório em modelo murino. **Metodologia:** A revisão sistemática foi executada segundo as diretrizes do PRISMA.20 nas seguintes bases de dados: Embase, Medline/PubMed, Scopus, e Web of Science; e a potencial atividade anti-inflamatória em camundongos (*Mus musculus*), albinos, cepa *Swiss* de ambos os sexos, com massa corpórea entre 20-30 g pelos ensaios de formalina, edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina, araquidônico (AA) e prostaglandina E₂ (PGE₂), edema de orelha induzido por óleo de cróton e granuloma induzido pela implantação de *pellets* de algodão, todos com resultados comparados aos do grupo controle negativo (CEUA 00346/2019-2). **Resultados e discussões:** Na revisão sistemática foram encontrados artigos usando os descritores: *terpinolene* “AND” *activity* “OR” *properties* “OR” *therapeutic* “OR” *treatment*. Posteriormente, foram retirados os artigos duplicados e, após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, resultou na seleção de 57 artigos. A análise destes artigos demonstrou que o terpinoleno possui toxicidade *in vitro* e *in vivo* (inseticida, larvicida, repelente, acaricida) bem caracterizada e, perfil de bioatividades antifúngica, antibacteriana e antiviral e, ambos perfis, correlacionados com a atividade antioxidante. Avaliação da ação anti-inflamatória tópica no edema de orelha induzido por óleo de cróton mostrou que todos as concentrações testadas (5, 10 e 20 mg/mL) exerceram efeitos antiedematogênicos significantes. O terpinoleno demonstrou significativa ação anti-inflamatória, sendo a dose de 200 mg/kg a mais efetiva. Além disso, o terpinoleno (200 mg/kg) demonstrou efeitos analgésicos significantes no teste de formalina, com a redução dos tempos de lambadura e mordedura na fase 1 e 2. Todas as doses (50, 100 e 200 mg/kg) do terpinoleno inibiram o edema de pata induzido por carragenina, e a dose de 200 mg/kg nos edemas de pata induzidos por dextrana, histamina (inibição discreta e tardia), AA e PGE₂. Sugerindo que os seus efeitos anti-inflamatórios podem resultar da ação na via dos eicosanóides (AA e PGE₂). Em modelo de inflamação crônica (granuloma induzido pela implantação de *pellets* de algodão), foi observado que a dose de 200 mg/kg, foi capaz de reduzir do peso dos *pellets* e o teor de proteínas totais. **Conclusões:** Os dados levantados indicaram haver uma necessidade de explorar pesquisas que elucidem seu mecanismo de ação e potenciais usos ambientais e terapêuticos. Foi demonstrado, por meio de ensaios pré-clínicos que a ação anti-inflamatória do terpinoleno está possivelmente relacionado com a capacidade de interferência na via dos eicosanóides, redução do potencial oxidativo por decorrente da ação antioxidante e redução da liberação de citocinas. No entanto, devido à sua ampla diversidade de atividades biológicas, o terpinoleno certamente motivará o interesse da pesquisa científica, o que poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos produtos.

Palavras-Chave: Terpinoleno. Inflamação. Modelo murino. Revisão sistemática. Atividade Antiedematogênica.

Agradecimentos: URCA, PPQB, LFQM, CNPq, Capes, Finep e Funcap.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

Como o estudo de substâncias naturais ou produzidas pelo homem para a inflamação e outras atividades impactam na vida das pessoas? Quando estamos com o dente inflamado, vermelho, inchado e muito dolorido, é comum utilizar remédios chamados anti-inflamatórios para reverter esses sintomas. Nesse estudo, foram realizados vários experimentos os quais mostraram que o terpinoleno, uma substância presente em várias plantas, é capaz de reduzir os sintomas que provocam desconfortos da inflamação. Nossas pesquisas também mostraram que esta substância tem uma ação contra insetos, pragas, além de outras atividades. Assim, este estudo ajudou a demonstrar a possibilidade deste composto para tratamento da inflamação, produção de repelentes, entre outros, servindo como uma estrutura modelo para a fabricação de novos medicamentos.

Biological activities of terpinolene: systematic review and anti-inflammatory effect in a murine model.

ABSTRACT

Introduction: Terpinolene is a fat-soluble monoterpene present in several plant species. To date, studies on the various actions of this terpene are few in the scientific literature, hindering the access and understanding necessary for the evolution of research and future development of new products. **Objective:** To elucidate the biological potential of terpinolene, listing its bioactivities, and to evaluate its anti-inflammatory potential in a murine model. **Methodology:** A systematic review was performed according to the PRISMA guidelines. 20 guidelines in the following databases: Embase, Medline/PubMed, Scopus, and Web of Science; and the potential anti-inflammatory activity in albino Swiss strain mice (*Mus musculus*) of both sexes, with body mass between 20-30 g by the formalin, carrageenan-induced paw edema, dextran, histamine, and arachidonic acid (AA) assays, arachidonic acid (AA) and prostaglandin E₂ (PGE₂), ear edema induced by croton oil and granuloma induced by cotton *pellet* implantation, all with results compared to the negative control group (CEUA 00346/2019-2). **Results and discussions:** In the systematic review, articles were found using the descriptors: terpinolene "AND" activity "OR" properties "OR" therapeutic "OR" treatment. Subsequently, duplicate articles were removed and, after applying the inclusion and exclusion criteria, resulted in the selection of 57 articles. The analysis of these articles showed that terpinolene has well-characterized *in vitro* and *in vivo* toxicity (insecticide, larvicide, repellent, acaricide) and antifungal, antibacterial, and antiviral bioactivity profiles, both profiles correlated with antioxidant activity. Evaluation of the topical anti-inflammatory action on ear edema induced by croton oil showed that all concentrations tested (5, 10, and 20 mg/mL) exerted significant antiedematogenic effects. Terpinolene demonstrated significant anti-inflammatory action, with the 200 mg/kg dose being the most effective. In addition, terpinolene (200 mg/kg) demonstrated significant analgesic effects in the formalin test, with reduced licking and biting times in phases 1 and 2. All doses (50, 100, and 200 mg/kg) of terpinolene inhibited carrageenan-induced paw edema, and the 200 mg/kg dose induced paw edema by dextran, histamine (mild and late inhibition), AA, and PGE₂. Suggesting that its anti-inflammatory feats may result from acting on the eicosanoid pathway (AA and PGE₂). In a model of chronic inflammation (granuloma induced by the implantation of cotton *pellets*), it was observed that the dose of 200 mg/kg, was able to reduce the weight of the *pellets* and the total protein content. **Conclusions:** The data collected indicated that there is a need to explore research to elucidate its mechanism of action and potential environmental and therapeutic uses. It was demonstrated through pre-clinical trials that the anti-inflammatory action of terpinolene is possibly related to its ability to interfere with the eicosanoid pathway, reduce the oxidative potential due to antioxidant action, and reduce cytokine release. However, due to its wide diversity of biological activities, terpinolene will certainly motivate the interest of scientific research, which can significantly contribute to the development of new products.

Keywords: Terpinolene. Inflammation. Murine model. Systematic review. Antiedematogenic activity.

Acknowledgements: URCA, PPQB, LFQM, CNPq, Capes, Finep e Funcap.

Em pesquisas recentes vem surgindo a necessidade de conhecer as potencialidades dos compostos químicos, as pesquisas são conduzidas constantemente a fim de identificar de forma ágil e confiável as aplicações farmacológicas desses compostos, dentre eles, os derivados de plantas medicinais se destacam pelas mais diversas propriedades já utilizadas na medicina tradicional. Para tal, as investigações são executadas por meio de metodologias que respeitam os parâmetros éticos vigentes para a melhor avaliação com protocolos e técnicas disponíveis, possibilitando uma abordagem pertinente considerando as limitações inerentes ao processo (ANIMALS, 2011; GIL, 2008; GOMES, Renata de Pinho *et al.*, 2012; MENDONÇA; ANDRADE; FLORENZANO, 2006).

Os processos metodológicos aplicados geram resultados que, por sua vez, são disseminados por meio da divulgação científica. Tais achados podem ser publicados em diferentes formatos, incluindo principalmente artigos primários ou revisões (GOMES, Isabelle Sena; CAMINHA, 2014).

O presente trabalho de dissertação propôs identificar a atividade anti-inflamatória em modelo murino do composto terpinoleno (originando um artigo primário com os dados experimentais) e realizar uma revisão sistemática de suas bioatividades. Embora a pesquisa tenha-se iniciado com o estudo experimental da atividade anti-inflamatória, o fluxo da dissertação apresenta primeiro a revisão sistemática (a primeira a ser concluída devido a paralização das atividades durante as fases mais críticas do período pandêmico e as medidas sanitárias impossibilitarem o deslocamento a partir do mês de março de 2020 às dependências da Universidade Regional do Cariri (URCA) para a realização dos experimentos previstos e incerteza na obtenção de resultados suficientes para submeter o artigo anteriormente à qualificação e defesa), e, posteriormente os ensaios anti-inflamatórios foram complementados para comporem o segundo artigo, o qual será submetido em breve.

Em relação a revisão sistemática, esta foi executada metodologicamente segundo as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews e MetaAnalyses*, com busca de artigos realizada em bases de dados através de descritores específicos a fim de compilar em um só artigo diversas informações pertinentes ao terpinoleno, dispersas na literatura científica e disponível em artigos científicos originais (primários), elencando todas as atividades já publicadas a respeito desse composto no período estipulado.

Anteriormente ao registro e execução da revisão, foi realizada uma pesquisa com descritores a fim de triar a melhor alternativa para execução da revisão sistemática. Constatou-se que esse monoterpene é amplamente descrito na composição química de diversas plantas medicinais e seus respectivos extratos. Entretanto, as propriedades farmacológicas do terpinoleno estudado isoladamente (composto puro) são pouco recorrentes quando comparados à gama de atividades

biológicas das plantas medicinais que tem o terpinoleno presente na composição, e eram mais escassos ainda em buscas com descritores representativos de uma ação farmacológica específica. Tendo em vista a baixa acessibilidade, a revisão foi conduzida de modo a elencar todas as atividades biológicas em ensaios pré-clínicos elencadas acerca do terpinoleno.

Além da revisão sistemática, foram realizados ensaios de triagem da avaliação anti-inflamatória, especialmente voltados à ação antiedematogênica. Uma vez que o aprofundamento do papel anti-inflamatório é vantajoso para evitar ou retardar progressão de uma inflamação aguda para danos irreversíveis da fase crônica, como a perda de função (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). Para essa determinação, são utilizados métodos a fim de avaliar se o terpinoleno é ou não capaz de reduzir os danos inflamatórios por meio de modelos experimentais aliados a respostas orgânicas e os princípios farmacologicamente associados. Embora os modelos delimitados para compor esse estudo sejam principalmente relacionados ao sinal cardinal: edema (avaliação do potencial antiedematogênico) por injeção intraplantar de agente irritante, também foram realizados um modelo tópico e um de inflamação crônica.

Segundo Schmid-Schönbein (2006), edema é um dos sinais cardinais da inflamação caracterizado por promover aumento do volume da pata. Nesses estudos, os pesquisadores avaliam a resposta através de observação se há inibição do edema e, dependendo do resultado: supressão, indiferença ou ativação dos causadores desse sinal inflamatório, os mediadores químicos envolvidos respondem de acordo com o agente indutor, possibilitando relacionar à via de sinalização (LAM; FERRELL, 1989; PATIL *et al.*, 2019; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Em relação a possível efetividade do terpinoleno, a metodologia foi estruturada para identificar inicialmente se o composto agia de forma anti-inflamatória e/ou antinociceptiva por meio do teste de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992), no qual observou-se efeito promissor para ambas as fases, mas com inibição mais representativa na nocicepção mediada por mediadores inflamatórios (fase 2) e optamos por mais ensaios por essa vertente. Com relação a investigação do possível efeito antiedematogênico, foram realizados: edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton (TUBARO *et al.*, 1986), edema de pata induzido por carragenina, dextrana 1% (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962), histamina 1% (MALING *et al.*, 1974), ácido araquidônico (DIMARTINO *et al.*, 1987), prostaglandina E₂ (CAMPOS; CALIXTO, 1995) para identificação de possível via relacionada a efetividade do terpinoleno e a avaliação do perfil anti-inflamatório crônico foi identificada por meio do granuloma induzido pela aplicação de *pellets* de algodão (LALITHA; SETHURAMAN, 2010) auxiliados pela obtenção dos valores da pesagem e dosagem de proteínas totais dos *pellets*. Esses ensaios podem ser encontrados de forma mais detalhada na metodologia expandida (item 7.1) e nos capítulos II (Revisão sistemática) e III (ensaios

experimentais da atividade anti-inflamatória). Desta forma esta dissertação apresenta a estrutura mostrada na Figura 1

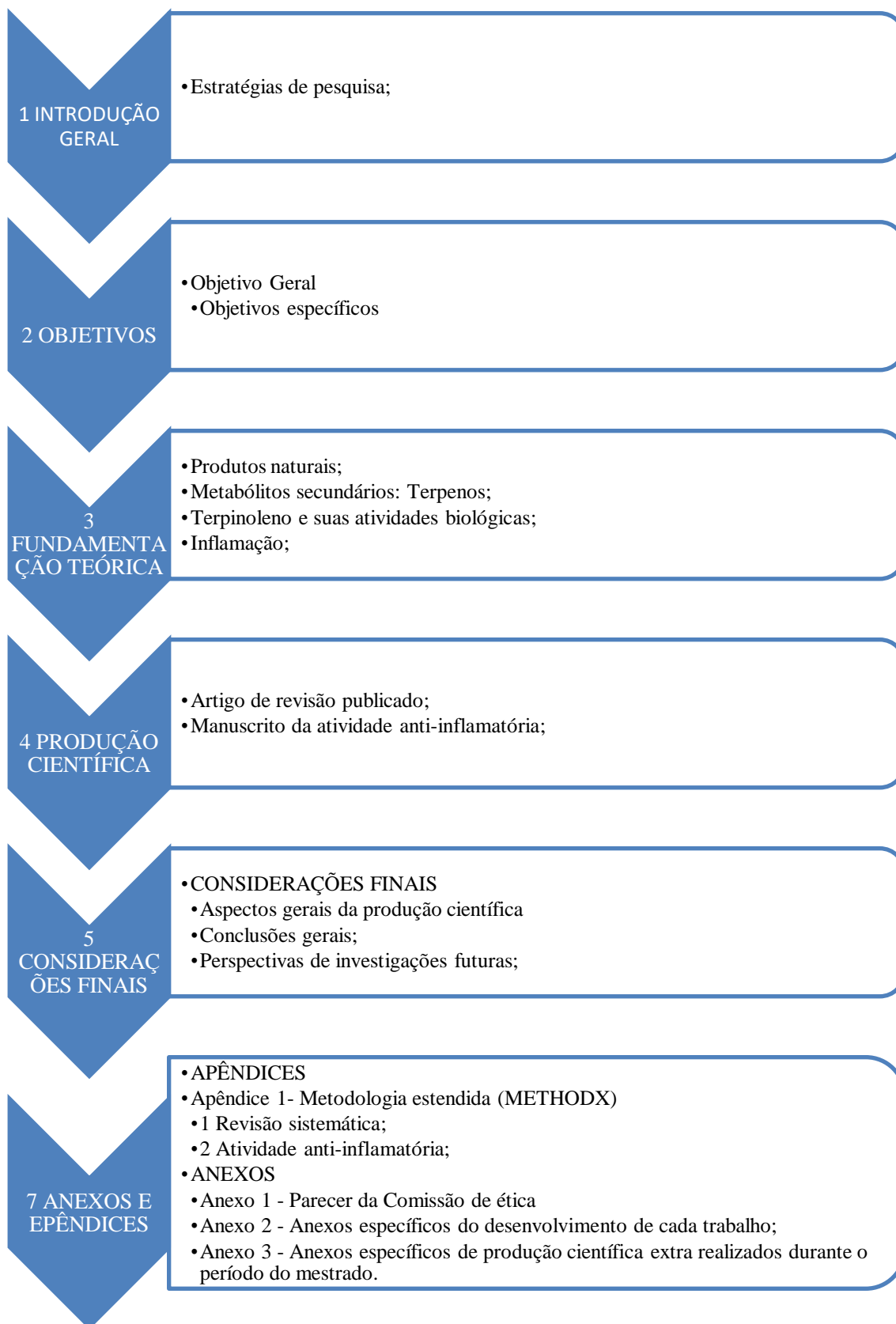


Figura 1: Organograma geral da dissertação

2.1. Objetivo Geral

Identificar as atividades biológicas do terpinoleno por meio de revisão sistemática e efeito anti-inflamatório em modelos experimentais murinos.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar as atividades biológicas disponíveis na literatura através de revisão sistemática;
- Delimitar os possíveis perfis de ação do terpinoleno por predição computacional;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do terpinoleno por via tópica (ação local) através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (agudo);
- Estudar o efeito do terpinoleno sobre a atividade anti-inflamatória sistêmica através do modelo de edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico e prostaglandina E₂;
- Investigar a ação do terpinoleno no modelo de inflamação crônica induzido pela implantação de *pellets* de algodão.

A inflamação é um mecanismo orgânico motivado a garantir a defesa e homeostase, entretanto, quando persistente, configura-se de um problema de saúde por sua manifestação clínica com sinais e sintomas indesejáveis (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; VIVIER; MALISSEN, 2005).

Sendo a dor, um sinal particularmente incômodo em ambas as etapas (inflamação aguda ou tardia) e que quando o dano que provocou a inflamação não é revertido, ou há estímulo inflamatório persistente, ocorrem agravos cada vez mais graves e/ou irreversíveis, característicos em doenças crônico-degenerativas. Portanto, estudos para eleger alternativas anti-inflamatórias são importantes, desde a busca por possibilidades terapêuticas em substituição aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), classe de fármacos que promovem desconforto aos usuários por promoverem inúmeros efeitos adversos (SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013; SILVA *et al.*, 2019) tornando a investigação do efeito anti-inflamatório de substâncias cada vez frequente.

Substâncias bioativas para a inflamação são comumente analisadas quanto a sua capacidade de minimizar efeitos indesejados, seja em seu uso isolado ou quando administrado de forma combinada a anti-inflamatórios alopáticos já utilizados na terapêutica convencional, a fim de promover propriedades sinérgicas com esses fármacos, o que podem culminar na substituição ou utilização conciliada à medicação convencional, demandando de doses inferiores para atingir a eficácia significativa (ANSARI; MORAIET; AHMAD, 2014). Nas identificações para esse e outros potenciais terapêuticos, a pesquisa científica é uma ferramenta utilizada com a finalidade de resolver questionamentos, solucionar problemas, validar ferramentas, dentre outras utilidades. Amplos estudos são realizados preliminarmente, como ocorre nos pré-clínicos, compreendidos por ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo* (em animais não humanos), estes testes são realizados em ambiente extremamente controlado, permitindo menor interferência externa, maior confiança e reprodutibilidade. Sendo importantes para identificar efeitos danosos que os compostos podem oferecer à saúde humana anteriormente à aplicação clínica, reduzindo a exposição precoce da população (GOMES *et al.*, 2012).

O composto elencado para a condução dessa pesquisa foi o terpinoleno, monoterpene amplamente encontrado em várias espécies vegetais e já é encontrado na formulação de aromatizantes, perfumes e produtos de limpeza (FALK *et al.*, 1990). Em relação a sua atuação na produção de medicamentos ainda não é destacada, embora já hajam diversas bioatividades. Em estudo de Menezes e colaboradores (2021). Identificou-se que, dentre outras atividades, o terpinoleno já tem muitos resultados antioxidantes, isso sugere possível modulação no potencial anti-inflamatório mesmo que ainda demande estudos para se elucidar de forma mais aprofundada.

Acerca do potencial anti-inflamatório do terpinoleno em si, ainda há poucas informações disseminadas até o presente momento. Recentemente encontradas por meio dos estudos de Christo Scherer *et al.* (2019) e Macedo *et al.* (2016) que avaliam o potencial do terpinoleno frente a parâmetros inflamatórios em ensaios *in vitro* e *in vivo* respectivamente. Tendo em vista a baixa acessibilidade de estudos do potencial anti-inflamatório e a importância da atuação de novos ativos na terapêutica da inflamação motivou nossa avaliação em modelo experimental.

O projeto inicial de execução do mestrado contemplava exclusivamente as etapas experimentais de avaliação anti-inflamatória do terpinoleno, entretanto, diante da impossibilidade de realizar novos experimentos em função das medidas sanitárias restritivas instaladas frente a pandemia ocasionada pelo Covid-19, surgiu a necessidade de um trabalho alternativo, o qual decidimos identificar de forma mais completa quais outras atividades biológicas esse composto é capaz de exercer que esteja comprovada na literatura científica por meio de revisão sistemática, capaz de elencar uma diversidade de informações correlatas a respeito de um tema em específico.

Tendo em vista todos os aspectos apresentados, fica evidente a relevância da exploração do potencial anti-inflamatório, bem como elencar as atividades do terpinoleno por revisão sistemática (de elevado nível de evidência e metodologia confiável), adequada para atualizações em saúde de modo geral e capaz de proporcionar apresentação de dados sucinta e acessível a pesquisadores (GOMES; CAMINHA, 2014; THOMAS; NELSON; SILVERMAN, 2009) cujas pesquisas também se desenvolvem a partir desse terpeno.

Portanto, o presente estudo visou elucidar a possível atividade anti-inflamatória do terpinoleno por meio de estudos experimentais *in vivo*, e discriminar as atividades biológicas deste descritas na literatura científica por meio de revisão sistemática.

3.1 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são de uso rotineiro na medicina tradicional, cujos compostos interagem com diversos mecanismos celulares propiciando efeitos biológicos, podendo modular respostas fisiológicas como: proliferação celular, resposta imunológica e apoptose, possibilitando atuações terapêuticas ou tóxicas, depender da situação a qual está inserido e dimensão de impacto que pode promover (CASANOVA; COSTA, 2017). Os vegetais e seus derivados com estudos comprovativos são de elevada relevância e segurança para o desenvolvimento de produtos e até de novas biomoléculas que, quando bem empregadas, apontam benefícios consideráveis à saúde e bem-estar. Mesmo com o advento e preocupação cada vez mais difundido à avaliação desses vegetais e seus componentes, grande parcela destes não possui, ainda, comprovação científica que valide a segurança de sua utilização, tornando necessários avanços nas pesquisas para este propósito (BOLZANI, 2016).

Nesse aspecto, a incorporação e evolução da química de produtos naturais é importante para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos, dentre outros, bem como embasar a utilização racional dos produtos e insumos desenvolvidos ou otimizados. Essa aplicação estimula a busca por compreender e interligar os mecanismos ativos e as estruturas químicas presentes nas substâncias obtidas a partir da biodiversidade brasileira (BOLZANI, 2016) propiciando o uso racional que, por meio da identificação do potencial dos produtos naturais e seus derivados, é possível identificar sua efetividade benéfica ou prejudicial, direcionando sua utilização ou descontinuação (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A realização adequada das etapas necessárias para obtenção de insumos é essencial, desde a coleta até o processamento de amostras, pois não só afetará a qualidade do produto final, mas também evitar danos ambientais em casos de coletas irregulares (CUNHA E SILVA *et al.*, 2012; PEGLOW; VELLOSO, 2002), entretanto, se realizadas apropriadamente, a utilização de substâncias de origem natural tendem a provocar menos danos ao meio ambiente e demandam menor custo de execução do que produtos de origem sintética (ANSARI; MORAIET; AHMAD, 2014)

As atividades com extratos vegetais são amplamente investigadas por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro* para possível aplicação nas áreas de cosmética, alimentícia e perfumaria (FELIPE; BICAS, 2017), entretanto, por se tratarem de misturas complexas (alta heterogeneidade de compostos), os estudos valorizam cada vez mais a compreensão de compostos isolados, de forma a distinguir a substância estudada da efetividade apresentada sem interferência de demais componentes presentes no extrato, elencando o ou os reais responsáveis pela ação farmacológica (FELIPE; BICAS, 2017; PATEL, 2015). Dessa forma, o estudo de compostos isolados configura-se como uma alternativa cada vez mais utilizada para elucidação das bioatividades e de respostas orgânicas obtidas através de experimentações.

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: TERPENOS

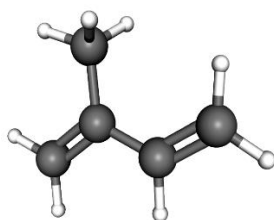
O metabolismo vegetal é essencialmente dividido em primário e secundário, sendo o primeiro (primário) essencial para manter a sobrevivência das plantas, presentes grupos como ácidos nucleicos, açúcares, aminoácidos e lipídeos, que compõe a manutenção básica do organismo, enquanto que o secundário apresentam uma abordagem especializada (FAMIANI *et al.*, 2019; FELIPE; BICAS, 2017; KROYMANN, 2011).

Os metabólitos secundários são substratos do desenvolvimento de seres vivos como vegetais e algumas espécies de fungos e bactérias, eles existem por consequência evolutiva de 140 milhões de anos (MEWALAL *et al.*, 2017). Tendo origem a partir do metabolismo orgânico na biossíntese de compostos, sendo capazes de realizar atração de polinizadores e proteção a fatores degradantes como: temperatura, ataque de patógenos, herbivoria e estresse de acordo com a natureza do ser vivo e as

condições as quais este é exposto (FELIPE; BICAS, 2017). Estes metabólitos podem possuir diferentes classes químicas como: alcaloides, terpenóides, polifenólicos e fenilpropanoides (BORGES *et al.*, 2017)

Inseridos na classificação de metabólitos secundários, os terpenos, também conhecidos como “alcenos naturais”, são hidrocarbonetos compostos por unidades de isopreno (PERVEEN, 2018; SINGH; SHARMA, 2015), facilmente encontrados em óleos essenciais apresentando-se com diversas estruturas químicas e atuações que permitem a ampla exploração pelos ramos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (CASANOVA; COSTA, 2017; PADUCH *et al.*, 2007).

Figura 2: Estrutura química do isopreno



Representação tridimensional - 3D (b) do isopreno

Fonte: PubChem (Isoprene | C₅H₈ - PUBCHEM, 2021)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoprene#section=3D-Conformer&fullscreen=true>

Os terpenos e terpenóides conferem atividades já comprovadas como: neurotrófica, citotóxica e antimalárica (MAIMONE; BARAN, 2007), anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (DE MARTINO *et al.*, 2015; FELIPE; BICAS, 2017) que denotam possível utilização para futuros protótipos farmacológicos

A subunidade comum aos terpenos chama-se isopreno (2-metilbutadieno), com estrutura composta por cinco carbonos (C₅) (L. RUZICKA, 1953). A regra do isopreno é bem aplicada para identificar a maior parte das subclasses dos terpenos, uma vez que estes são formalmente divisíveis e nomeados de acordo com a quantidade de unidades isopreno (C₅) unidas, sendo os terpenos compreendidos desde suas formas mais simples (isopreno), e ficando gradativamente cada vez mais complexos, incluindo monoterpênicos (C₁₀), sesquiterpênicos (C₁₅), diterpênicos (C₂₀), sesterpênicos (C₂₅) e triterpênicos (C₃₀) e tetraterpênicos (C₄₀) (PERVEEN, 2018).

As rotas de síntese estão essencialmente divididas em 2: DXP (1- deoxy-d-xylulose-5-phosphate) no interior do plasmídeo e a via do mevalonato ocorre no citosol celular (KIRBY; KEASLING, 2009). Os monoterpênicos, se originam no interior de plasmídeos a partir do GPP (pirofosfato de geranilo) pela via DXP (1- deoxy-d-xylulose-5-phosphate) (figura 3). Compreendem uma das subdivisões mais simples dentre os terpenos, facilmente encontrados nos óleos essenciais representando 90% da sua constituição (BAKKALI *et al.*, 2008; GUIMARÃES; QUINTANS;

QUINTANS-JÚNIOR, 2013; SATO, 2013), possuem dez carbonos em sua estrutura com duas unidades de isopreno ligadas, baixa massa molecular e elevada volatilidade (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014).

Os monoterpenos podem ser classificados como terpenos e terpenóides. Ambos estão contidos na mesma classe, entretanto diferem quimicamente, pois os monoterpenos possuem cadeia de hidrocarbonetos apenas, e os monoterpenóides foram desnaturados por oxidação ou quimicamente modificados, contendo heteroátomos observada, principalmente pela presença de compostos oxigenados em sua estrutura (SALAKHUTDINOV; VOLCHO; YAROVAYA, 2017). Suas características denotam larga viabilidade no desenvolvimento de novos medicamentos, aromas e fragrâncias (resultado da propriedade volátil dos monoterpenos), estimulando o recente interesse da indústria farmacêutica (GHASEMI *et al.*, 2009) e de nutracêuticos (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013). Pesquisas científicas comprovam suas funções antimicrobianas, hipotensivas, anti-inflamatórias e antipruriginosas (KIM, Taejoon *et al.*, 2020; KORDALI *et al.*, 2005; MAHIZAN *et al.*, 2019).

Figura 3: Vias de sinalização para biossíntese de metabólitos secundários por meio do metabolismo vegetal

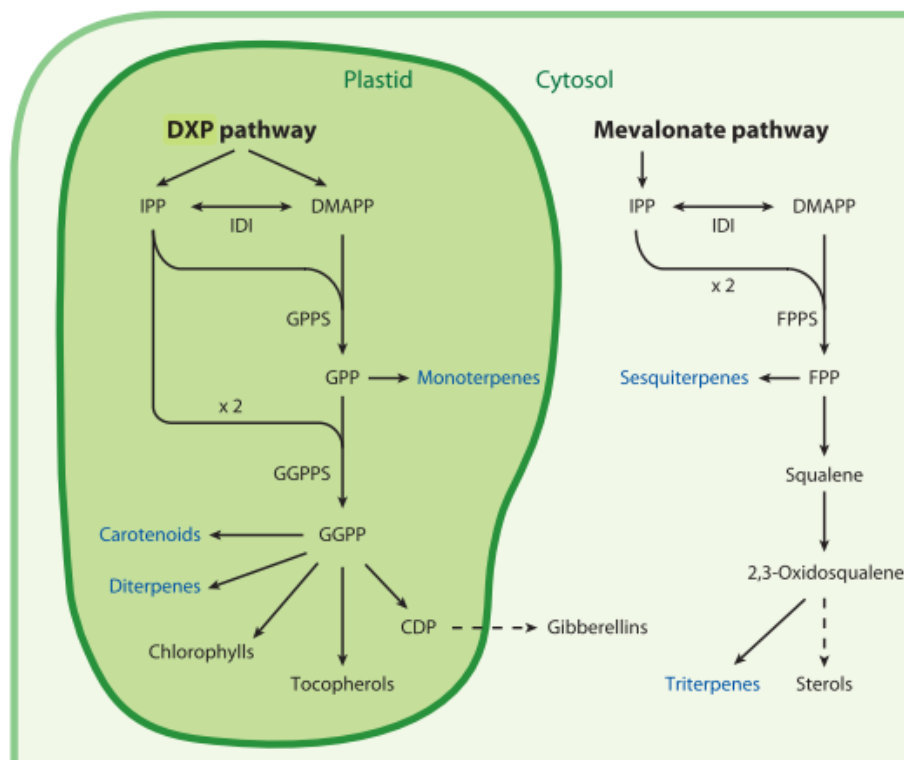


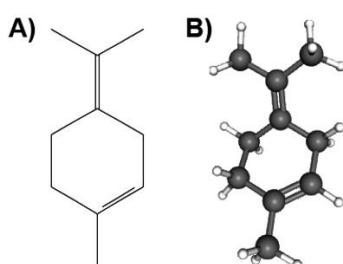
Figura obtida no artigo elaborado por Kirby e Keasling (2009)

<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.043008.091955>

3.3 TERPINOLENO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O terpinoleno é um monoterpene monocíclico de baixo peso molecular, não oxigenado, com dez carbonos em sua estrutura (Fórmula molecular: $C_{10}H_{16}$; IUPAC: 1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene) (PUBCHEM, 2021) (figura 4) que corresponde a ligação de duas unidades isopreno (C_5), com alta lipofilicidade e solubilidade sanguínea, e é usado em aromatizantes, perfumes e produtos de limpeza (FALK *et al.*, 1990). Esse monoterpene é comumente encontrado na composição de óleos vegetais como em algumas espécies de pinheiros (GAD; AL-SAYED; AYOUB, 2021), *Rosmarinus officinalis* L. (NAPOLI *et al.*, 2015), *Illicium verum* Hook. f. (anis estrelado) (SHAHRAJABIAN; SUN; CHENG, 2021), entre outras.

Figura 4: Estrutura química do terpinoleno



Representação unidimensional: $C_{10}H_{16}$, 2D (A) e 3D (B) do terpinoleno

Fonte: PubChem (Terpinolene | $C_{10}H_{16}$ - PUBCHEM, 2021)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terpinolene#section=Structures&fullscreen=true>

Estudos identificaram que o terpinoleno tem produção superior em plantas expostas a estímulos agressores externos (como alterações ambientais, climáticas e parasitas), quando comparados com outras não submetidas à mesma incitação nociva (FÄLDT *et al.*, 2003; PONTIN *et al.*, 2015; SAFAEIAN; AMIN; AZARNIVAND, 2012). A defesa especializada desenvolvida pelo vegetal frente a esses agentes sugere que o terpinoleno esteja intimamente relacionado com a efetividade expressa pela planta que o contém (BOLTON, 2009; FAMIANI *et al.*, 2019).

Evidências demonstram que extratos apresentando o terpinoleno em sua constituição, possuem um potente ação antiproliferativa para células tumorais por diminuição da expressão à proteína kinase 1, que permeia a proliferação celular e consequente progressão do câncer (OKUMURA *et al.*, 2012) e atividades biológicas como: antioxidante (CHEN *et al.*, 2004), antifúngica (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004) e ação larvicida (CONTI *et al.*, 2012). O terpinoleno (composto puro) demonstrou efetividade antiproliferativa contra células tumorais (AYDIN; TÜRKEZ; TAŞDEMİR, 2013), antifúngica (DAVIS *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2020), inseticida (DAVIS *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2020; PAVELA *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2020), dentre outras atividades previamente descritas na literatura científica.

Estudos realizados anteriormente apresentam dados em relação a ação anti-inflamatória do terpinoleno (DE CHRISTO SCHERER *et al.*, 2019; MACEDO *et al.*, 2016) e outros como Christo *et al.* (2019), Emami *et al.* (2011), Lu *et al.*, (2019), entre outros pesquisadores, demonstraram que o terpinoleno inibiu o estresse oxidativo, sendo ele possível candidato para a inflamação.

3.4 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é uma resposta orgânica que busca retornar ao estado homeostático e integridade tecidual. Ele faz parte da resposta imune, os quais podem ser estimulados por sinais de origem exógena (como patógenos) ou endógena, sejam eles de natureza física, química ou biológica (VIVIER; MALISSEN, 2005). Na existência de uma lesão tecidual, são acionados mecanismos imunes de controle a fim de limitar os danos e auxiliar a regeneração. Estes mecanismos estão inseridos na resposta inflamatória, caracterizada por quatro sinais cardinais: dor, rubor, calor, edema e, em alguns casos, culminando com perda total ou parcial da função (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). Essas respostas orgânicas geram ampliação do fluxo sanguíneo, vasodilatação, extravasamento de fluidos e influxo de células (FERRERO-MILIANI *et al.*, 2007).

Frente a um agente agressor, vários mecanismos são desencadeados, incluindo a inflamação, que é didaticamente dividida nas fases aguda e crônica. O processo inicial (agudo) é mediado, principalmente, pela ativação das células do sistema imunitário, como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), leucócitos mononucleares, células epiteliais e endoteliais. Este estágio da inflamação persiste por um curto período de tempo e geralmente traz resultados benéficos para a reparação do dano (NATHAN, 2012). Se o processo inflamatório persiste por um período maior (semanas ou meses), o estágio crônico considera-se instalado, ocorrendo intensa atividade leucocitária (macrófagos e linfócitos) na tentativa do reparo tecidual (RICKLIN; LAMBRIS, 2013).

A fase aguda promove alterações fisiológicas que envolvem uma sequência coordenada de eventos: a vasodilatação (possibilitando o aumento do fluxo sanguíneo no local) e permeabilidade vascular; a migração celular, principalmente de leucócitos, juntamente com aumento na expressão de moléculas de adesão; prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs), necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios como as citocinas fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (HUERRE; GOUNON, 1996; VIVIER; MALISSEN, 2005). Na fase crônica há participação de células como: macrófagos, mononucleares, macrófagos e plasmócitos, além de alterações presentes em doenças inflamatórias crônicas, incluído em doenças como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e reumatológicas (FERRERO-MILIANI *et al.*, 2007; NATHAN; DING, 2010).

No processo inflamatório, há diversos mediadores químicos relacionados. Os primeiros mediadores liberados são a histamina e a serotonina (5-HT) produzidos por mastócitos, basófilos e plaquetas sanguíneas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). A histamina provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (eritema e edema) e estimula as terminações nervosas sensoriais, assim como está relacionada a reações de hipersensibilidade (MACGLASHAN, 2003). A serotonina por sua vez, no sistema imune, ativa monócitos humanos e impede a sua apoptose, modula a produção de citocinas e quimiocinas em monócitos (DÜRK *et al.*, 2005; SOGA *et al.*, 2007).

A persistência do processo inflamatório promove exposição prolongada a fatores degradantes que promovem danos potenciais ao organismo (NATHAN; DING, 2010). Portanto, os mecanismos para reversão da inflamação e integridade orgânica são importantes no reestabelecimento da homeostase e integridade orgânica, uma vez que eles visam impedir a agressão dos agentes (exógenos e endógenos), visando também reduzir lesões e danos potenciais.

Dentre as alternativas farmacológicas para reversão dos efeitos inflamatórios, os AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) são amplamente utilizados, eles promovem a depleção dos sinais cardinais da inflamação. Em contrapartida, a não seletividade farmacológica da maioria dos fármacos constituintes da classe interfere/compromete outros parâmetros fisiológicos provocam efeitos adversos consideráveis. Em busca de alternativas terapêuticas, a pesquisa por novos compostos com ação moduladora dos processos inflamatórios é uma área sempre em atualização (SILVA *et al.*, 2019).

A busca por compostos que reduzam os efeitos adversos promovidos por AINEs aliados ao potencial de terpenos como supressores de processos inflamatórios vem sendo investigados nos últimos anos e mostrando resultados promissores (SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013). Entretanto, estudos com o terpinoleno, isoladamente, ainda são escassos na literatura científica, tendo sido encontrados apenas dois estudos associados diretamente à atividade anti-inflamatória (DE CHRISTO SCHERER *et al.*, 2019; MACEDO *et al.*, 2016).

Portanto, considerando que os anti-inflamatórios, embora amplamente empregados, não são impecáveis (eles realmente demonstram limitações já supracitadas), juntamente à identificação de estudos com utilização dos monoterpenos no uso para contenção de processos inflamatórios severos (SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013) e aliados à propensão do terpinoleno em agir de forma efetiva em outros mecanismos que ocorrem simultaneamente a processos inflamatórios (como o antioxidante), nossos achados vem a contribuir com a sociedade científica fornecendo informações pertinentes as bioatividades desse monoterpeno e avaliação do seu potencial anti-inflamatório que auxiliará no crescente desenvolvimento de novos produtos e que propiciem a descoberta de alternativas com melhor custo-benefício no tratamento de doenças inflamatórias.

O artigo 1 trata do primeiro artigo desenvolvido durante a dissertação, obtido por meio de revisão sistemática acerca das atividades bioativas do terpinoleno em ensaios experimentais *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

Artigo 1 – Biological properties of terpinolene evidenced by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies: a systematic review

Autores: Isis Oliveira Menezes, Jackelyne Roberta Scherf, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Jullyana de Souza Siqueira Quintans, Henrique Douglas Melo Coutinho, Jaime Ribeiro Filho e Irwin Rose Alencar de Menezes

Jornal/Revista: Phytomedicine (<https://www.sciencedirect.com/journal/phytomedicine/>) /

QUALIS - A1

Situação: Publicado - Link:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711321003111>.

Resumo:

Contexto: O terpinoleno, um monoterpene que se encontra naturalmente em uma variedade de ervas, é amplamente utilizado como agente aromatizante na indústria. Embora esteja bem estabelecido na literatura que o terpinoleno é um componente importante dos extratos de plantas, as propriedades biológicas e a potencial utilização terapêutica deste composto continuam a ser pouco exploradas. Propósito: Este trabalho visou responder à seguinte pergunta orientadora: "Quais são as atividades biológicas do terpinoleno demonstradas através de ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*?". Desenho e metodologia do estudo: Foi realizada uma revisão sistemática em quatro bases de dados eletrônicas (Embase, Web of Science, Scopus, e PubMed) de acordo com as diretrizes *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews e MetaAnalyses* (PRISMA), usando os seguintes termos de pesquisa: *terpinolene* "AND" *activity* "OR" *properties* "OR" *treatment* "OR" *therapeutic*. Esta pesquisa incluiu manuscritos publicados entre 1960 e Junho de 2020. A seleção dos estudos foi realizada por duas pesquisadoras de forma independente segundo os critérios pré-definidos. Resultados: A pesquisa inicial encontrou um total de 2449 artigos. No entanto, apenas 57 deles foram selecionados por satisfazerem os critérios de inclusão e responderem à pergunta orientadora. A análise destes estudos indicou que o terpinoleno apresenta uma série de efeitos biológicos, dos

quais se destacam as atividades antioxidantes, larvicidas e inseticidas. Apesar das evidências demonstrarem que o terpinoleno tem o potencial de ser utilizado num amplo contexto farmacológico, os mecanismos subjacentes aos seus efeitos celulares e moleculares demandam ser melhor esclarecidos. Além disso, a eficácia e segurança *in vivo* da administração deste composto tem sido avaliada superficialmente através de ensaios pré-clínicos e clínicos. Por conseguinte, este estudo salienta a importância de caracterizar os aspectos biológicos e os mecanismos de ação deste composto natural. Conclusão: Os dados resumidos na presente revisão sistemática demonstraram o potencial farmacológico do terpinoleno. No entanto, a maioria dos estudos incluídos nesta revisão fornecem uma caracterização superficial dos efeitos biológicos do terpinoleno e, portanto, são necessárias mais investigações que elucidem o seu mecanismo de ação e potenciais benefícios terapêuticos através de ensaios pré-clínicos e clínicos. Devido à sua vasta gama de diferentes atividades biológicas, o terpinoleno irá, certamente, atrair o interesse de investigações científicas, o que poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos produtos com aplicações tanto terapêuticas como ambientais.

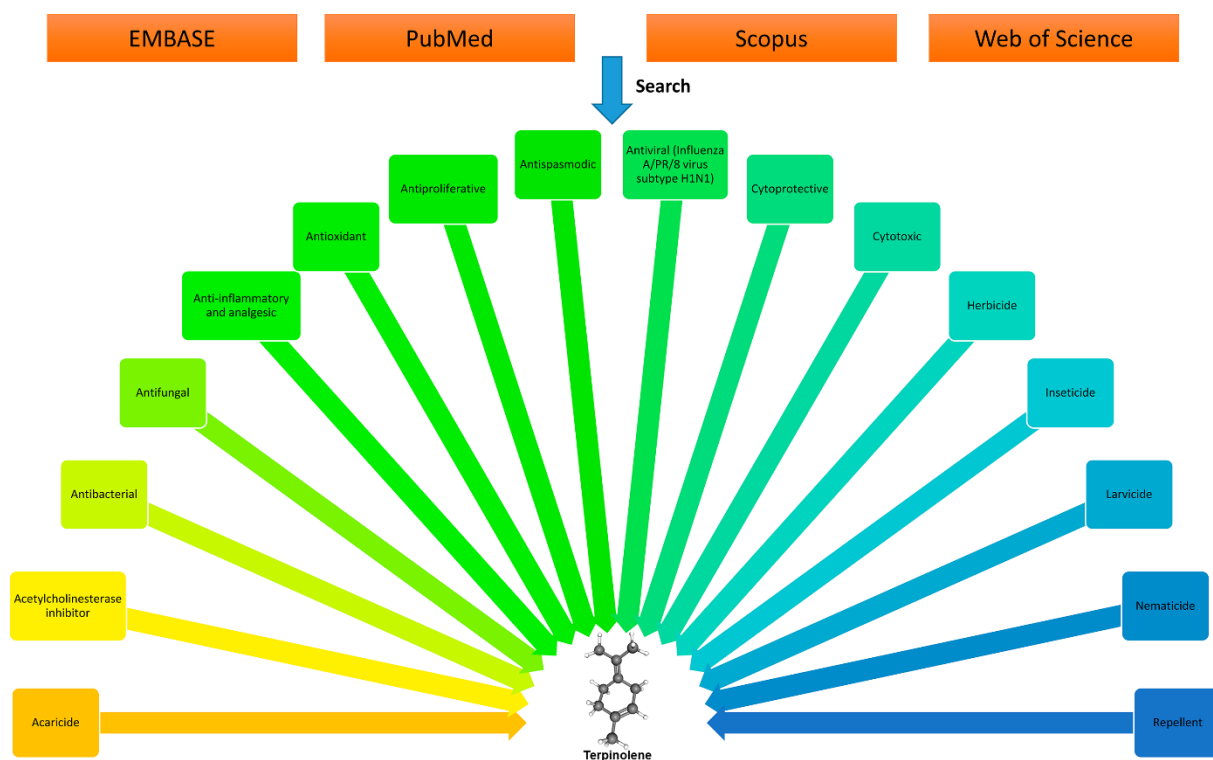


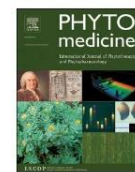
Figura 5: Graphical abstract do artigo de revisão



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phymed

Review

Biological properties of terpinolene evidenced by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies: A systematic review

Isis Oliveira Menezes^a, Jackelyne Roberta Scherf^b, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a, Andreza Guedes Barbosa Ramos^a, Jullyana de Souza Siqueira Quintans^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^d, Jaime Ribeiro-Filho^e, Irwin Rose Alencar de Menezes^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry - LFQM, Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE 63105-000, Brazil

^b Antibiotics department - DB, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE 50670 901, Brazil

^c Department of Physiology - DFS, Federal University of Sergipe - UFS, São Cristóvão, SE 49100-000, Brazil

^d Microbiology and Molecular Biology Laboratory - LMBM, Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE 63105-000, Brazil

^e Laboratory of Investigation in Genetics and Translational Hematology, Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, BA 40296-710, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Terpinolene
Biological properties
Systematic review
PRISMA guidelines

ABSTRACT

Background: Terpinolene, a monoterpene that is naturally found in a variety of herbs, is widely used as a flavoring agent in the industry. Although it's well established in the literature that terpinolene is an important component of plant extracts, the biological properties and the potential therapeutic use of this compound remain poorly explored.

Purpose: This work aimed to answer the following guiding question: "What are the biological activities of terpinolene demonstrated through *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* assays?".

Study design and methodology: A systematic review was carried out in four electronic databases (Embase, Web of Science, Scopus, and PubMed) according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines, using the following search terms: terpinolene "AND" activity "OR" properties "OR" therapeutic "OR" treatment. This search included manuscripts published between 1960 and June 2020. Study selection was conducted by two independent reviewers according to predefined criteria.

Results: The initial search found a total of 2449 articles. However, only 57 of them were selected as they met the inclusion criteria and answered the guiding question. The analysis of these studies indicated that terpinolene presents a series of biological effects, from which the antioxidant, larvicide, and insecticide activities stand out. Despite the evidence demonstrating that terpinolene has the potential to be used in a broad pharmacological context, the mechanisms underlying its cellular and molecular effects remain to be better elucidated. In addition, the *in vivo* efficacy and safety of the administration of this compound have been poorly evaluated through either preclinical and clinical trials. Therefore, this study highlights the importance of characterizing the biological aspects and mechanisms of action of this natural compound.

Conclusion: The data summarized in the present systematic review demonstrates the pharmacological potential of terpinolene. Nevertheless, most studies included in this review provide a superficial characterization of terpinolene biological effects and therefore, further research elucidating its mechanism of action and potential therapeutic benefits through preclinical and clinical trials are required. Nevertheless, due to its wide range of

Abbreviations: AchE, acetylcholinesterase; CFA, complete freud's adjuvant; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (free radical elimination test); EC50, concentration of a drug that gives half-maximal response; EtBr, ethidium bromide absorption assay; FRAP, ferric reducing / antioxidant power; HEWLs, hen egg white lysozyme; IC50, concentration of drug required for 50% inhibition; iNOs, inducible nitric oxide synthase; IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry; LC50, lethal concentration of 50% animal exposed; LC90, lethal concentration of 90% animal exposed; LDH, lactate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; MIC, minimum Inhibitory concentration; MTT, cell viability assay; NBT, nitro blue atrazolium reduction assay; NDMA, N-nitrosodimethylamine; NF-κB, nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells; NO, nitric oxide; PRISMA, preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses; RoB, risk of bias; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SCGE, single cell gel electrophoresis; SEM, scanning electron microscopy; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; ThT, thioflavin T; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; TOC, total oxidant capacity; TOS, total oxidant status.

* Corresponding author.

E-mail address: irwin.alencar@urca.br (I.R.A. de Menezes).

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153768>

Received 8 March 2021; Received in revised form 16 August 2021; Accepted 16 September 2021

Available online 26 September 2021

0944-7113/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

different biological activities, terpinolene will certainly attract the interest of scientific research, which could significantly contribute to the development of new products with both therapeutic and environmental applications.

Introduction

The therapeutic underestimation of chemical compounds derived from plant species directly impacts the development of new drugs. While nature provides a wide variety of herbs at low cost and whose consumption viability is recognized by several ethnopharmacological data, the bioactivity of isolated compounds needs to be confirmed through biological tests. In this context, computational (*in silico*), *in vitro*, and *in vivo* tests are fundamental tools in the scientific investigation of innovative therapies, contributing to guiding the therapeutic use of natural products (Geris, 2014; Tang et al., 2006).

Plants use metabolic processes to maintain their survival and specialized functions, which are divided into primary and secondary metabolism (Famiani et al., 2019). The primary metabolism is characterized by a set of vital processes responsible for the organism's essential maintenance through the generation of amino acids, simple sugars, lipids, and nucleic acids. On the other hand, the secondary metabolism comprises the generation of compounds that assist in growth and adaptation to stress conditions using substrates originated by the primary metabolism (Famiani et al., 2019; Felipe and Bicas, 2017; Keeling and Bohlmann, 2006; Kroymann, 2011).

Terpenes are structurally diverse secondary metabolites whose chemical and biological properties have been widely investigated in scientific research (Casanova and Costa, 2017). This class of metabolites has several subgroups, including monoterpenes, which have the simplest structure among them, comprising about 90% of the composition of essential oils (Bakkali et al., 2008; Guimarães et al., 2013). Terpinolene is a 10-carbon monoterpene composed of a cyclic main chain formed by two linked isoprene units to which methyl and propane are linked (Molecular formula: $C_{10}H_{16}$; IUPAC: 1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene

(Fig. 1)). With regard to the physicochemical aspects, terpinolene is a water-white to light amber-colored liquid with low water solubility (9.5 mg/l at 25 °C) and high liposolubility (estimated log Kow = 4.47). Due to its low molecular mass (136.23 g/mol) and high volatility, terpinolene is widely used in the production of fragrances (Ghasemi et al., 2009; Guimarães et al., 2013). This compound is widely found in the chemical composition of aromatic plants (Gasiński et al., 2020; Petrović et al., 2018), especially those of Asian origin such as blackcurrant (*Ribes rubrum*) and saffron (*Curcuma longa*) (Tisserand and Young, 2014).

Evidence has placed terpinolene as a bioactive compound with significant pharmacological activities, among which the antifungal (Davis et al., 2018; Pinto et al., 2020), antioxidant (de Christo Scherer et al., 2019; Lu et al., 2019), and insecticide (Liu et al., 2020; Pavela et al., 2018; Ribeiro et al., 2019; Ribeiro et al., 2020) are highlighted. Additionally, computational predictions by Bosc and collaborators (2019) indicate that terpinolene has a high confidence level (90%) and significant activity threshold (>6) for the following targets: Muscarinic acetylcholine receptor M1 (*Rattus norvegicus*), Prostanoid EP4 receptor (*Rattus norvegicus*), Serotonin 3a (5-HT3a) receptor (*Rattus norvegicus*), and Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS (*Homo sapiens*) (Compound Report Card, 2021). However, few preclinical studies have investigated its biological activities through *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* experiments. Additionally, there is currently no clinical trial supporting the potential of terpinolene as a therapeutic compound.

Therefore, this systematic review aims to report the biological activities of terpinolene demonstrated through preclinical studies, attempting to contribute to further research addressing the therapeutic potential of this monoterpene.

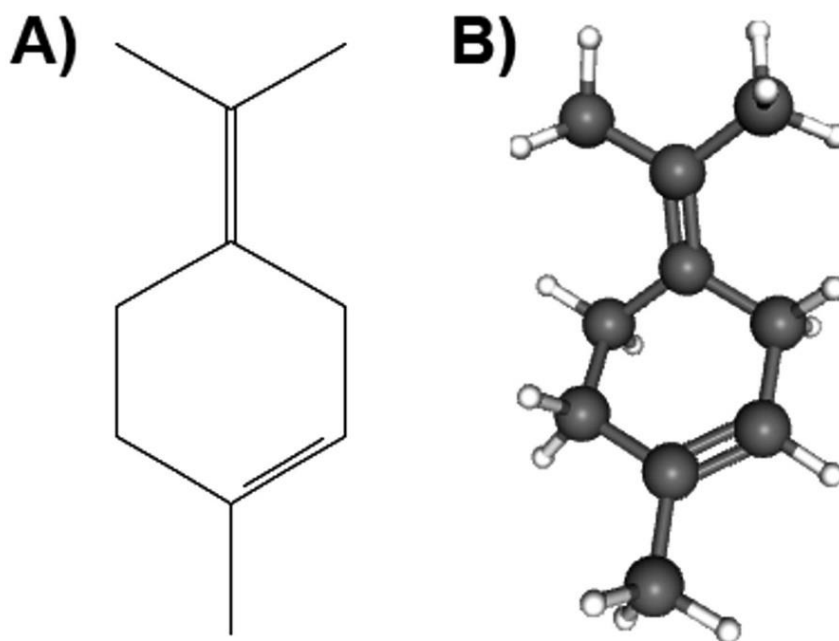


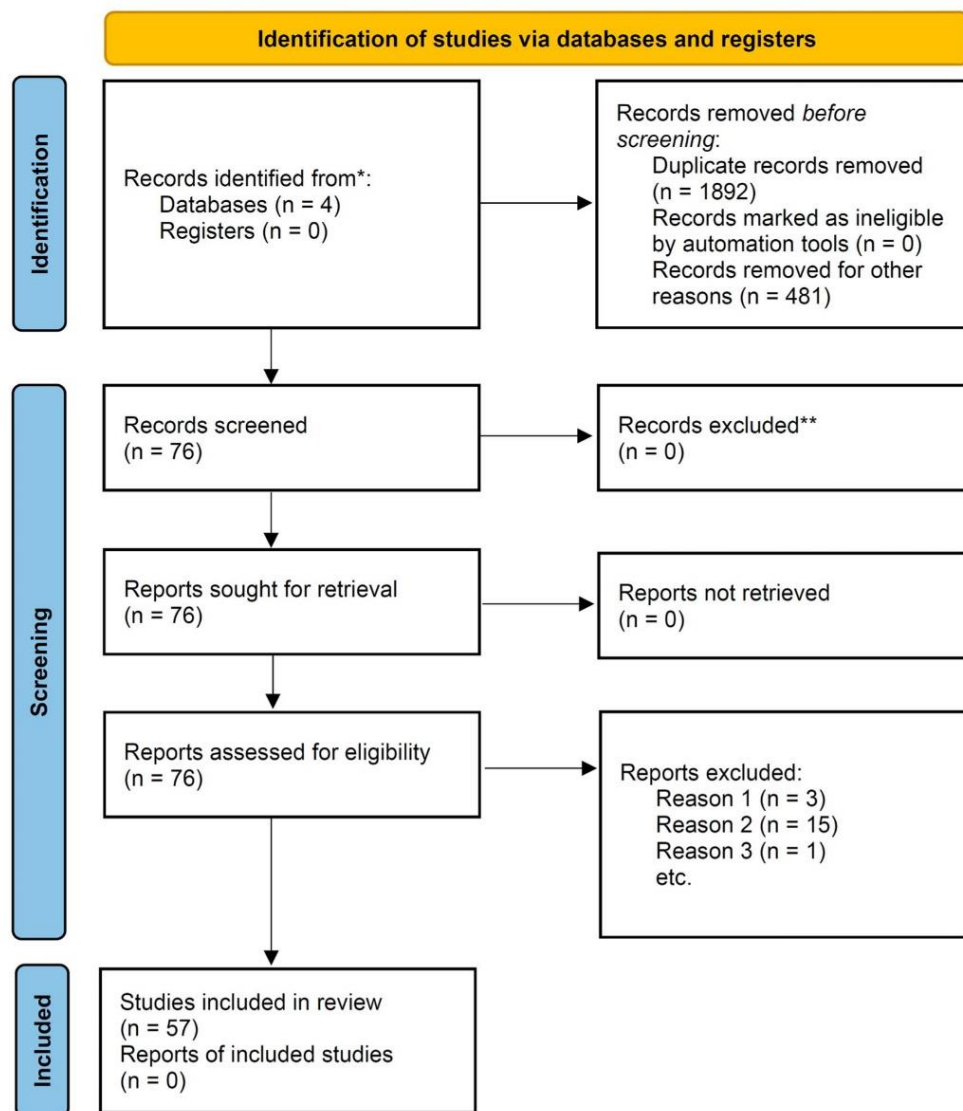
Fig. 1. The chemical structure of terpinolene | $C_{10}H_{16}$ emphasizing the bidimensional (A) and tridimensional (B) atomic positions ("Terpinolene | $C_{10}H_{16}$ - PubChem" 2021).

Results

Selection of studies

The initial literature search using the previously described keywords found a total of 2908 articles in the selected databases, including 261 articles in Embase, 381 articles in Medline, 4618 articles in Scopus, 189 articles in PubMed, and 459 articles in the Web of Science. After

removing 1992 duplicates of articles indexed in two or more databases and applying the inclusion and exclusion criteria, 76 articles were selected for the final analysis. Finally, following the individual verification of full texts, a total of 57 articles were obtained and included in the present review (Fig. 2).



*Consider, if feasible to do so, reporting the number of records identified from each database or register searched (rather than the total number across all databases/registers).

**If automation tools were used, indicate how many records were excluded by a human and how many were excluded by automation tools.

Fig. 2. Flowchart detailing literature search according to the PRISMA statement. Reason 1:Articles with unavailable full texts, reason 2: Articles presenting mixtures of compounds whose activity is not attributed to terpinolene alone, reason 3: Does not deal with the action of terpinolene.

Data extraction and analysis

Considering the type of study, most articles were performed exclusively *in vitro* ($n = 38$), followed by studies carried out exclusively *in vivo* ($n = 15$), both *in vitro* and *in vivo* ($n = 2$), both *in silico* and *in vitro* ($n = 1$) and exclusively *in silico* ($n = 1$). Concerning the procedures used to perform the analyses, only *in silico* studies (3%), were carried out using the same method: molecular docking. Differently, *in vitro* (67.1%) and *in vivo* (29.9%) studies were carried out following different protocols. To better describe the most relevant aspects of the articles, they were organized according to the type of study, as shown in Tables 1–3. Those articles using two or more types of preclinical trials were presented in different tables according to the corresponding type of assay.

The first article reporting terpinolene biological activity was published in 1967. Since then, although the number of publications has gradually fluctuated over the years, a growing number of publications from 2009 indicates increasing interest in this subject in the last years (Fig. 3a). Most of the investigations were carried out in the Asian continent, where China (6 publications), Taiwan (6 publications), Japan (5 publications), and Korea (5 publications) stand out as leading countries in this field of research. In the Americas, Brazil stands out with ten publications on this issue. In comparison with the Americas, Europe demonstrates a similar interest in the topic (Fig. 3b).

The selected studies were separated and grouped into three experimental categories: *in silico* (Table 1), *in vitro* (Table 2), and *in vivo* (Table 3). Also, those articles that use 2 types of preclinical assays for terpinolene activity analysis were presented in 2 distinct tables obeying the corresponding type of assay. The articles analyzed in this research revealed that terpinolene has several pharmacological activities reported in the literature, including anti-cholinesterase, sedative, cytotoxic, cytoprotective, anti-inflammatory, antispasmodic, antiproliferative, antinociceptive, lysozyme ligand and n-nitrosamine inhibitor, and P-glycoprotein. As reported for other terpenes, the antioxidant and toxic (insecticide/larvicide) properties stand out as the most investigated activities of terpinolene (Fig. 4).

With regard to the toxic activity of terpinolene, most articles reported its cytotoxic and insecticidal properties. The data reporting terpinolene cytotoxicity indicate that this compound present low toxicity when compared with other monoterpenes. Accordingly, *in vitro* assays using human lymphocytes showed that terpinolene present a concentration-dependent cytotoxicity, causing significant decreased on cell viability at concentrations greater than 100 mg/l, which was not associated with the occurrence of genotoxic effects (Turkez et al., 2015). A study investigating the toxicity of orally administered terpinolene in rats found a LD₅₀ of 4390 mg/kg, which characterizes compounds with low systemic toxicity. The same study showed that a single topical application of this compound at a dose of 5000 mg/kg resulted in transitory erythema and edema during the first few days of observation (Opdyke, 1976). Thus, based on the available literature data, terpinolene can be considered a safe drug for both topical and systemic use.

Methodological quality /risk of bias of the studies

This systematic review is a pioneering study listing the different properties of terpinolene in a biological context. Then only *in vivo* trials were used to compose this study had their risk of bias analyzed in order to determine the reliability of their methods. It is worth mentioning that

in vivo methods are of crucial importance in the evaluation of the pharmacokinetic (e.g., absorption, metabolism, bioavailability) and pharmacodynamic (e.g., potency, affinity, selectivity) parameters of a given compound, which allow the identification of the cellular or biochemical events modulated by the drug such as gene transcription, protein expression and metabolic changes associated to disease status. To analyze the methodological quality and risk of bias, we used the SYRCLE's RoB tool based on the Cochrane RoB tool (Higgins et al., 2011; Hooijmans et al., 2014) adjusted for specific aspects of experimental studies in non-human animals. This methodology evaluates the risk of bias from the answer to 10 questions, including selection bias, performance bias, friction bias, detection bias, and other biases (Hooijmans et al., 2014). Some underlying evidence indicates that the animal environment and experimental conditions, such as lighting, humidity, temperature, etc., can influence the results of the study because they promote behavioral and biochemical changes (Claassen, 2013; Hooijmans et al., 2014; Johnston and Nevalainen, 2010). Group allocation (random selection) and blind treatments are also relevant for the methodological quality. Here, the articles were evaluated both qualitatively (Fig. 5) and quantitatively (Fig. 6), allowing the reproducibility in the choice of risk criteria of this study. The classification was initially performed independently by two researchers (IOM and JRS) in agreement with the kappa index = 0.748. Subsequently, the possible divergences in the classification of the studies were resolved by consensus and expressed in Fig. 5 and 6.

According to the present analysis, none of the *in vivo* studies included in the present review presented a low risk of bias. From a total of 17 studies, seven had a high risk of bias in any of the judging questions, while 30% of the manuscripts evaluated presented an unclear risk of bias. According to the score shown in Fig. 7, an analysis of the manuscripts using *in vivo* experiments found 5.29%, 42.35%, and 52.35% of articles presenting a high, uncertain, and low risk of bias, respectively. Although more than 50% of the studies have shown a low risk of bias, it is noteworthy mentioning that the number of questions answered with unclear risk was high, which might be due to the lack of information attested during the reading of manuscripts.

With regard to the judging questions, it was observed that questions 1, 2, 4, and 10 presented the lowest risk of bias, as only one article (6%) did not adequately describe the sequence of events. All articles were apparently carried out following the methodology proposed with an understandable and precise description. Additionally, almost all of them (94%) were free from other bias problems such as contamination by drugs, the addition of new animals to replace unwanted animals in the groups, the influence of funders, or errors in analysis units.

All selected studies correctly described the objectives, methodology, outcomes, and main findings obtained. However, no information on blinding strategy was provided. Nevertheless, no detailed evidence was found in any of the studies that indicated that they were more prone to errors or manipulation of results than those using a blinding methodology (Bebarta et al., 2003; Hooijmans et al., 2014).

Computationally predicted molecular targets for terpinolene

In order to contribute to further research investigating the potential therapeutic properties of terpinolene, we used target prediction based on physicochemical parameters and structure similarity to evaluate other potential molecular targets for this monoterpene. Our analysis

Table 1
In silico terpinolene studies.

Author	Year	Country	Method	Results	Biological Activity	Reference
Politi et al.	2017	Brazil	Molecular docking	Polar and hydrophobic interactions with the catalytic site of ClAChE1 (competitive inhibitor).	Acetylcholinesterase inhibitor	(Politi et al. 2017)
Morshedi et al.	2014	Iran	Molecular docking	Amino acids, E35, W62, W63 (near RII), and V109, A 110 (RIV) were the residues with the highest proximity to terpinolene.	Binding to HEWLs (chicken egg white lysozyme)	(Morshedi et al. 2014)

Table 2
In vitro terpinolene studies.

Author	Year	Country	Method	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
Zhao et al.	2020	China	Analysis of: Antibacterial activity against <i>C. vulgaris</i> Oxidative damage Cellular morphology Photosynthetic activity Antioxidant capacity Nitrogen metabolism Abundance of transcribed genes	0.551, 0.881, 1.079, 1.233, and 1.470 mM	Inhibited algae growth and the photosynthetic activity of <i>C. vulgaris</i> . Induced concentration-dependent changes in the microstructure	Herbicide	(Zhao et al., 2020)
Liu et al.	2020	Taiwan	Analysis of AchE inhibition through calorimetry	The work cites the effective concentrations but does not explain which concentrations were tested.	IC ₅₀ = 1.10 ± 0.17 (µl/ml) - Terpinolene exhibited the best inhibitory activity among the tested compounds	AchE inhibition (<i>in vitro</i>)	(Liu et al., 2020)
Pinto et al.	2020	Brazil	Antifungal activity against <i>Microsporium canis</i> LM 216, <i>Trichophyton interdigitale</i> H6 (ATCC MYA 3108) and <i>T. interdigitale</i> Δ mdr2 Effect on membrane functionality Analysis of K ⁺ efflux by turbidimetry	1024 µg/ml to 1 µg/ml	MIC: 128 µg/mL against <i>T. interdigitale</i> Δ mdr2 Terpinolene MIC > 1,024 µg/ml). Increased K ⁺ efflux (<i>p</i> < 0.05), affecting membrane functions	Antifungal	(Pinto et al., 2020)
Lu et al.	2019	India	DPPH free radical elimination test Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) generation test	100 µl/ml (concentration used to obtain EC ₅₀ values)	Strong antioxidant activity: EC ₅₀ (DPPH): 65.77 ± 4.98. EC ₅₀ (TBARS) < 5 Caused 70% inhibition of lipid peroxidation, increasing antioxidant activity	Antioxidant	(Lu et al., 2019)
De Christo et al.	2019	Brazil	Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) NO quantification ABTS cationic radical elimination assay Cytotoxicity evaluation: MTT test Wound healing activity: Fibroblast proliferation and migration iNOs expression Determination of intracellular superoxide anion: Nitro blue atrazolium reduction assay (NBT) Cytokine quantification (ELISA) NF-kB activity	Wound healing 10, 100 e 200 µM NF-kB activity 1-100 µM Other tests: 1.0- 200 µM	Weak FRAP activity IC ₅₀ for NO production: 409,4 ± 1,6 IC ₅₀ for ABTS: 497.4 ± 14.5 µM Non-cytotoxic to fibroblasts L929 and RAW 267.7 macrophages (200 µM). Proliferative effects were observed in L929 cells: 121.5 ± 3.2% at 200 µM. Wound healing activity: Increased proliferation and migration of fibroblasts. 36.3 ± 4.8% (maximum stimulating effect) at 200 µM Suppressed NO production in RAW 264.7 macrophages: 41.3 ± 1.4% at 200 µM; No effects on LPS stimulated cells Inhibition of intracellular superoxide production: 82.1 ± 3.5% (100 µM) and 82.6 ± 3.5% (200 µM) Reduced production of IL-6 and TNF-α	Wound healing, anti-inflammatory, cytoprotective, and antioxidant	(de Christo Scherer et al., 2019)

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Author	Year	Country	Method	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
Pavela et al.	2018	Czech Republic	Evaluation of insecticide activity against <i>Culex quinquefasciatus</i>	5.0 to 200.0 µl/l	Inhibition (14.3 ± 2.5%) of TNF-α induced NF-κB activity at 100 µM LC ₅₀ : 25.7 µl/l LC ₉₀ : 50.1 µl/l X ² : 0.043	Insecticide	(Pavela et al., 2018)
Ngahang kamte et al.	2018	Itália	Antiparasitic activity against <i>Trypanosoma brucei</i>	Tested concentrations not mentioned	Active against <i>Trypanosoma brucei</i> EC ₅₀ = 0.035 µg/ml (0.26 µM)	Tripinocide	(Ngahang Kamte et al., 2018)
Davis et al.	2018	USA	Antifungal activity against <i>L. abietinum</i>	1, 5, and 10%	Complete inhibition of fungal growth at 5% and 10%.	Antifungal	(Davis et al., 2018)
Julio et al.	2017	Spain	Nematicide activity against <i>Meloidogyne javanica</i>	Nematicide activity: 1.0 and 0.5 mg/ml	Inactive against <i>Meloidogyne javanica</i>	Nematicide	(Julio et al., 2017)
Kweka et al.	2016	Brazil	Phytotoxic activity	Phytotoxic activity: 0.4 and 0.2 mg / mL	Weak phytotoxicity against <i>S. lycopersicum</i> (25%)	Larvicide	(Kweka et al., 2016)
			Larvicidal activity against <i>Anopheles gambiae</i> s.s.	200, 100, 50, 25 and 12.5 mg/l	LC ₅₀ at 12h: 493.38 mg/l 24h: 404.71 mg/l 48h: 343.79 mg/l 72h: 259.40 mg/l		
da Silva et al.	2016	Brazil	Larvicidal activity against <i>A. aegypti</i>	0.01 mg/ml (10 mg + 0.1 g Tween 80 + distilled water)	Larvicidal activity: LC ₅₀ = 31,16 ppm	Larvicide	(da Silva et al., 2016)
			Effects on oviposition		No effect on oviposition		
			Effects on intestinal enzymes (L ₄)		Inhibited proteolytic polypeptides of intestinal enzymes L ₄		
			Zymography of intestinal proteases		Inhibited the activity of trypsin like enzymes		
Yu et al.	2015	China	Effect on gut trypsin activity Effect of terpinoleone on the mycelial growth of <i>Botrytis cinerea</i>	0.25, 0.5, 1.0, and 1.5 µl/ml	Strong and concentration-dependent antifungal activity	Antifungal	(Yu et al., 2015)
Turkez et al.	2015	Peru	Cytotoxicity to human blood cells	10, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 mg/l	Increased LDH release	Cytotoxic	(Turkez et al., 2015)
			Lactate dehydrogenase (LDH) release assay		Reduction of cell viability at 150 and 200 mg/l.	Antioxidant	
			Cell Viability Assay (MTT)		Increased lymphocyte counts in peripheral blood		
			Cytogenetic assays		No changes in 8-OH-dG levels (nucleic acid oxidation)		
			Oxidation of nucleic acid		Total oxidant capacity (TOC) was decreased at 200 mg/l, stable at 100 and 150 mg/l and increased at 10, 25, 50, and 75 mg/l).		
			Analysis of total antioxidant capacity and total oxidizing status		Total oxidant status (TOS) was increased at 150 and 200		
			Cell Viability Assay (MTT)				
			Cytogenetic assays				
			Oxidation of nucleic acid				
			Analysis of total antioxidant capacity and total oxidizing status				
Pontin et al.	2015	Argentina	Antifungal activity against <i>Sclerotium cepivorum</i> (disk diffusion)	Antifungal activity and sclerotia count: 2, 3, 4 and 5 µg/disc	Antifungal activity: 2.0 and 5.0 µg/disc. Strong inhibition of mycelial growth (about 93%)	Antifungal	(Pontin et al., 2015)
			Number of sclerotia produced by <i>S. cepivorum</i>		Reduction of sclerotia production by about 18%		
			Ethidium bromide absorption assay (EtBr)		Possible disturbance of fungal membrane integrity by interference in EtBr		

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Author	Year	Country	Method	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
			Scanning electron microscopy (SEM)		absorption		
Pavela	2015	Czech Republic	Acute toxicity against <i>Culex quinquefasciatus</i> larvae	5 to 250 µg/l	SEM: Hyphae with shorter branching, morphological changes, and partial distortion Mortality at 250 mg/l = 93.2±2.8 LC ₂₅ = 11 mg/l (9–15) LC ₅₀ = 21 mg/l (18–27) LC ₉₀ = 245 mg/l (206–278)	Larvicide	(Pavela, 2015)
Ali et al.	2015	USA	Mosquito bite bioassays Larvicidal activity against <i>A. aegypti</i> and <i>A. quadrimaculatus</i>	Mosquito bite: 25 mmol/cm ² Larvicidal assay: 1,5 a 0,0375 mg/cm ²	Larval mortality (%) = 6.5 <i>A. aegypti</i> CE ₅₀ ppm = 14.0 LV ₉₀ ppm = 21.4 <i>A. Quadrimaculatus</i> CE ₅₀ ppm = 20.9 LV ₉₀ ppm = 36.8	Larvicide	(Ali et al., 2015)
Morshedi et al.	2014	Irā	Fluorescence assay LDH release Flow cytometry	2%	Protection of PC12 cells from HEWL-induced cytotoxicity (chicken egg white lysozyme) Reduced fluorescence intensity, (prevented fibrillation over time)	Cytoprotective	(Morshedi et al., 2014)
Mademtzoglou et al.	2013	Greece	Activity against <i>Drosophila melanogaster</i>	2.5, 5.0, 7.5 and 10 µl/ml	Prevention of cell death induced by HEWLs: flow cytometry analysis showed a decrease in cell death by terpinolene treatment Genotoxic potential could not be assessed, as terpinolene caused mortality of <i>Drosophila</i> (data not shown)		(Mademtzoglou et al., 2013)
Lee et al.	2013	Taiwan	Somatic mutation and recombination test Antibacterial activity against <i>Propionibacterium acnes</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	0.80%	Inactive against <i>P. acnes</i> , Antibacterial activity against <i>S. aureus</i> . Reduction of 1.03±0.03 in disk diameter and e 6.25% in the MIC	Antibacterial	(Lee et al., 2013)
Aydin et al.	2013	Turkey	Antiproliferative and/or cytotoxic properties: (MIT) Comet Assay Genotoxic damage potential (single cell gel electrophoresis (SCGE)) TAC and TOS analysis	10, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/l	Potent antiproliferative agent for brain tumor cells (anti-cancer potential) Cytotoxic doses for neuronal cells: 100, 200, and 400 mg/l; Cytotoxic doses for neuroblastoma cells N2a 50, 100, 200, and 400 mg/l Comet assay: Non-genotoxic Primary neuron: Increase of TAC by 10, 25, and 50 mg/L and reduction by 400 mg/l; Increased TOS at 100, 200, and 400 mg/l N2a cells: Decreased TAC and increase TOS at 50, 100, 200, and 400 mg/l	Antiproliferative and antioxidant	(Aydin et al., 2013)
Ngan et al.	2012	Republic of Korea	Bacterial growth inhibition test MIC values (mg / ml): < 0.1 (extremely high), 0.1–0.62 (high), 0.62–1.25 (moderate), 1.25–2.5 (low) and > 2.5 (no growth inhibition)	2,5 a 0,1 mg/ml	Antibacterial activity against all tested bacteria. MIC of 0.16 mg/mL against <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium paraputrificum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; MIC of 0.31 mg/mL against <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Bifidobacterium</i>	Antibacterial	(Ngan et al., 2012)

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Author	Year	Country	Method	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
Conti et al.	2012	Italy	Larvicidal activity against <i>Aedes albopictus</i> : WHO (1991)	48 ppm	adolescentes, <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>) MIC of 0.62 mg/mL against <i>Clostridium difficile</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium butyricum</i>) MIC of 1.25 mg/mL against <i>Lactobacillus casei</i> Mortality (%): 43.33 ± 0.76	Larvicide	(Conti et al., 2012)
Garozzo et al.	2011	Italy	Activity against Influenza A/PR/8 virus subtype H1N1 in MDCK cells.	0.005%	Inhibition of virus replication EC ₅₀ = 0.00125% (v/v)	Antiviral	(Garozzo et al., 2011)
			Virucidal activity		Inhibition of viral replication at a specific stage (initial stage of the viral cycle)		
			Virus fixation inhibition assay				
			Haemagglutination inhibition assay		No interfere in the cellular fixation of the virus or viral adsorption		
			Neuraminidase inhibition		No significant inhibitory effect on neuraminidase inhibition		
Emami et al.	2011	Iran	Evaluation of <i>in vitro</i> antioxidant activity:	0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2, and 4 µl/ml	Antioxidant activity o	Antioxidant	(Emami et al., 2011)
			Rapid TLC screening for antioxidants		DPPH scavenging activity at 0.1 (3.83%), 0.5 (6.89%), 1 (9.64%), 2 (16.18%), and 4 µl/ml (30.16%)		
			DPPH free radical scavenging activity		Inhibition of deoxyribose degradation at 0.1 (20.90), 0.2 (24.85), 0.5 (21.65), 1 µl/ml (21.65)		
			Deoxyribose degradation test				
			Non-enzymatic lipid peroxidation test		Non-enzymatic lipid peroxidation test: 0.05 (52.77), 0.5 (38.64), 1 (32.16), 2 µl/ml (10.52)		
Bonesi et al.	2010	Italy	Cholinesterase inhibition assay	10, 25, 50, 100 and 200 µg/ml	AchE IC ₅₀ = 156.4 µg/ml BchE IC ₅₀ = 147.1 µg/ml	Cholinesterase inhibition (AchE and BchE)	(Bonesi et al., 2010)
Perumalsamy et al.	2009	Republic of Korea	Larvicidal activity (Toxicity)	1 to 200 ppm	Concentration-dependent anti-cholinesterase activity Toxic against <i>Cx. p. fallens</i> (LC ₅₀ = 11.85 ppm)	Larvicide	(Perumalsamy et al., 2009)
					Presented the highest toxicity against <i>Ochlerotatus Togui</i> (LC ₅₀ = 11.85 ppm)		
Garozzo et al.	2009	Italy	Antiviral activity against polio type 1, ECHO 9, Coxsackie B1, adeno type 2, herpes simplex (HSV) type 1 and 2 viruses	0.1 % a 0,0001 %	Inhibition of the influenza A-PR8 virus replication. The IC ₅₀ value (0.0012) was lower than the CD ₅₀ (0.012) of terpinolene	Antiviral	(Garozzo et al., 2009)
					Not effective against polio viruses 1, adeno 2, ECHO 9, Coxsackie B1, HSV-1, and HSV-2		
Cheng et al.	2009	Taiwan	Larvicidal activity against <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> .	100, 50, 25, 12.5, and 6.25 µg/ml	Strong larvicidal effect against <i>A. albopictus</i> <i>A. aegypti</i> : LC ₅₀ = 32.1 µg/ml LC ₉₀ = 83.6 µg/ml <i>A. albopictus</i> : LC ₅₀ = 22.0 µg/ml LC ₉₀ = 55.5 µg/ml	Larvicide	(Cheng et al., 2009)
Cheng et al.	2009	Taiwan		50, 25, 12.5, and 6.25 µg/ml	Larvicidal activity <i>Aedes aegypti</i>	Larvicide	(Cheng et al., 2009)

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Author	Year	Country	Method	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
			Larvicidal activity against <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> .		LC ₅₀ = 32.1 µg/ml LC ₉₀ > 50.0 µg/ml (not effective) <i>A. Albopictus</i> LC ₅₀ = 21.3 µg/ml LC ₉₀ = 48.0 µg/ml		
Riyazi et al.	2007	Germany	Evaluation of antispasmodic activity using isolated rat ileum in organ bath	1 mM	Antispasmodic effect on rat ileum by inhibiting maximum and biphasic contraction after 2.5 min at 1 mM through Interference with 5-HT ₃ receptors	Antispasmodic	(Riyazi et al., 2007)
Yoshida et al.	2006	Japan	Effects of terpenoids in the accumulation of [3H] digoxin in LLC-GA5-COL150 cells	1 mM	Terpinolene inhibited by 50% the efflux of [3H] digoxin mediated by glycoprotein P	P-glycoprotein inhibition	(Yoshida et al., 2006)
Kim et al.	2006	Korea	Classification of antimicrobial activity	2 mg/disk	LC ₅₀ = 481 µM No antibacterial activity observed	Bacteriostatic	(KIM et al., 2006)
Grassmann et al.	2005	Germany	Copper-induced LDL oxidation	0.01 a 0.25%	Terpinolene inhibits LDL oxidation at concentrations above 0. 01%	Antioxidant	(Graßmann et al., 2005)
Shin	2004	Korea	Antifungal analysis through the disk diffusion test	4 to 64 mg/ml	<i>C. albicans</i> MIC: 64 mg/ml (ineffective) <i>C. tropicalis</i> MIC: 32 mg/ml <i>C. utilis</i> MIC: 8 mg/ml	Antifungal	(Shin, 2004)
Kim et al.	2004	USA	Antioxidant capacity. 1 - DPPH free radical elimination test: 2 - Hexanal/hexanoic acid assay	0.19 mM and 180 mM	Weak inhibition of DPPH scavenging at 0.19 mM 65% inhibition of hexanal oxidation to hexanoic acid at 180 mM	Antioxidant	(Kim et al., 2004)
Grassmann et al.	2003	Germany	Copper-induced LDL oxidation	0.01 a 0.25%	Concentration-dependent inhibition of LDL oxidation. Increase in latency time up to 774 min.	Antioxidant	(Grassmann et al., 2003)
Ruberto and Baratta	2000	Italy	Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) Determination of a diene conjugated formation from linoleic acid by spectrophotometry.	1000, 500, and 100 ppm 10 ⁻² , 10 ⁻³ , and 10 ⁻⁴ M	Concentration-dependent antioxidant activity TBARS: 1000 ppm = 64.6 500 ppm = 56.3 100 ppm = 40.3 Diene formation rate 10 ⁻² M = 78.3 10 ⁻³ M = 22.0 10 ⁻⁴ M = 12.2	Antioxidant	(Ruberto and Baratta, 2000)
Choi et al.	2000	Japan	Free radical (DPPH) scavenging activity	235.2 mg/ml	DPPH scavenging activity (87.4%, 235.2 mg Trolox E/ml) 3.5-fold stronger than Standard Trolox.	Antioxidant	(Choi et al., 2000)
Dorman et al.	2000	Scotland	Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)	0.05 – 25,000 ppm	Almost 100% antioxidant activity at the concentration of 10000 ppm.	Antioxidant	(Dorman et al. 2000)
Sawamura et al.	1999	Japan	N-nitrosodimethylamine (NDMA) generation	10 µl	50% inhibition of NDMA generation	NDMA inhibition	(Sawamura et al., 1999)
Oh et al.	1967	USA	Antimicrobial activity	0.025 ml	Inhibition of sheep rumen microbe growth (-58%)	Antimicrobial	(Oh et al., 1967)

showed that the most likely targets for terpinolene interaction belong to the following categories: (1) Family A G protein-coupled receptors: Cannabinoid receptor 2, Adenosine A1 receptor, Prostanoid EP4 receptor, Acetylcholine receptor; (2) Nuclear receptors: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-α), Estrogen and Androgen Receptors; (3) Araquidonate oxidoreductase enzymes: 5-lipoxygenase; Cyclooxygenase-1; (4) Orphan receptor tyrosine kinase (RTK): Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS and (5) Other enzymes: Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme, Adenosine deaminase, Aminopeptidase N (Fig. 7). These findings corroborate the evidence demonstrated by the studies included in the present review and encourage the development of further research to better characterize the

pharmacological properties and potential mechanisms of action by this compound in a preclinical context.

Discussion

Terpenes are the largest group of natural bioactive compounds. Studies have shown that the production of these compounds is both influenced by genetic factors and the environmental conditions to which the plant is exposed. In this context, evidence has suggested that the fact that terpenes are produced as part of the defense mechanism of plants in response to stressful stimuli contributes significantly to their wide variety of biological effects. Among the terpenes, monoterpenes are widely

Table 3
In vivo terpinolene studies.

Author	Year	Country	Method	Route of Administration	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
Ribeiro et al.	2020	Brazil	Fumigation against <i>Benisia tabaci</i> Fecundity test	Fumigation	Fumigation: 2.0 to 6.0 µl/l air Fecundity test 2.0 µl/l air 20 µl	Terpinolene was the 3 rd most toxic compound and promoted a greater reduction in the number of eggs laid by <i>B. tabaci</i> LC ₅₀ = 172 ± 6 (µl/ml). Insecticide impact (IT): IT = 39.76 Synergistic insecticide effects with all tested compounds	Insecticide	(Ribeiro et al., 2020)
Liu et al.	2020	Taiwan	Toxicity against <i>Bacopa caroliniana</i>	Fumigation			Insecticide	(Liu et al., 2020)
Ribeiro et al.	2019	Brazil	Toxicity against <i>T. urticae</i> Fumigation test Residual contact test Fertility Bioassay	Fumigation and residual contact	Fumigation: 0.2 to 4.0 µl/l air Residual contact: 43 to 688 mg/ml Fertility: 0,4 µl/L de ar	Ensaio de Fumigation: Terpinolene was the most toxic compound. Residual contact test: Terpinolene had the lowest effect Fecundity bioassay: reduced the number of eggs laid by <i>T. urticae</i> by 24.53%	Acaricide	(Ribeiro et al., 2019a)
Ribeiro, et al.	2019	Brazil	Toxicity against <i>T. urticae</i> Fumigation test Residual contact test Fertility Bioassay	Fumigation and residual contact	Fumigation: 0.2 to 4.0 µl/l air Residual contact: 44 to 689 µl/ml Fecundity: 0.2 µl/l 5 to 90 µl/l	Terpinolene was the most toxic compound. LC ₅₀ (95%CI) = 2.07 (1.61-2.62); $\chi^2 = 5.29$ Low effect on residual contact LC ₅₀ (95%CI) = 263.06 (221.31-); $\chi^2 = 5.21$ Low reduction of fecundity High toxicity: 100% mortality by the last hour of testing	Insecticide and Repellent	(Ribeiro et al., 2019b)
Do Nascimento et al.	2018	Brazil	Fumigation assay	Fumigation			Insecticide	(do Nascimento et al., 2018)
Liang et al.	2018	China	Insecticide activity against <i>Tribolium castaneum</i> and <i>Lipocelis bostrychophila</i>	Fumigation	78, 63, 15, 73, 3, 15, 0.63, and 0.13 ml/cm ³	Toxic by fumigation against <i>T. castaneum</i> and <i>L. bostrychophila</i> Weak repellent activity against both insects	Insecticide	(Liang et al., 2018)
Born et al.	2018	Brazil	Acaricide activity against <i>Tetranychus urticae</i> Fumigation and residual contact assays	Fumigation Residual contact	Fumigation: 0.0002 a 16.0 µl/l Residual contact: 0.1 to 800.0 µl/ml	Fumigation assay LC ₅₀ (95% CI) = 1.08 (0.62–1.63) Residual contact LC ₅₀ (95% CI) = 341.91 (206.91–520.84)	Acaricide	(Born et al., 2018)
Zhang et al.	2017	China	Toxicity against <i>Musca domestica</i>	Fumigation	1.25, 2.5, 3.75, and 5 µl/l	LC ₅₀ = 1,84 µl/l	Insecticide	(Zhang et al., 2017)
Zhang et al.	2016	China	Toxicity against <i>Drosophila melanogaster</i>	Fumigation	Not stated	LC ₅₀ = 0.09 µl/l (04 0.14) LC ₉₀ = 0.62 µl/l (0.44 1.15)	Insecticide	(Zhang et al., 2016)
Macedo et al.	2016	Brazil	CFA induced inflammation in the rat Hyperalgesia Analysis of gastric lesions	Oral	3,125, 6,25, 12,5, and 25 mg/kg	Analgesic effect in the acute phase Inhibition of paw edema Inhibition of leukocyte infiltration in the paw Involvement of serotonergic pathways in the analgesic effect Absence of gastric lesions after 11 days of treatment Strong repellent activity against <i>A. aegypti</i> and <i>A. quadrinotatus</i>	Anti-inflammatory and analgesic	(Macedo et al., 2016)
Ali et al.	2015	USA	Repellent activity against <i>Aedes aegypti</i> and <i>A. quadrinotatus</i>	Fumigation	25 mmol/cm ²		Larvicide and insecticide	(Ali et al., 2015)
Ito and Ito	2013	Japan	Selective effect in ddY mice (olfactory deficiency) Mice with olfactory deficiency caused by zinc sulfate	Inhalation Intraperitoneal	Inhalation: Cotton soaked with 0.1 mg terpinolene/cage Intraperitoneal: 0.01 or 0.1 mg/kg	The motor activity of the mice was reduced to 67.8% after inhalation of terpinolene 0.1 mg/cage) Motor activity was reduced after i.p. administration: 31.3% (0.01 mg/kg) and 47.1% (0.1 mg/kg)	Sedative	(Ito and Ito, 2011)
Chang et al.	2012	Republic of Korea	Insecticide activity against KSS strain and two field collected STE and DJN colonies of <i>Blattella germanica</i> (L.) Residual contact Fumigation LD ₅₀ Determination	Fumigation	Not stated	LD ₅₀ against <i>B. germanica</i> : Females: KSS = 0.44 mg/cm ² , STE = 0.75 mg/cm ² ; and DJN = 0.84 mg/cm ² KSS Males = 0.28 mg/cm ²	Insecticide	(Chang et al., 2012)
Ito and Ito	2011	Japan		Inhalation	0.004, 0.04, 0.4 and 4 mg	SNC suppression Spontaneous locomotor activity reduced at the doses	Sedative	(Ito and Ito, 2011)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Author	Year	Country	Method	Route of Administration	Concentration	Results	Biological Activity	Reference
Wang et al.	2009	China	Sedative activities in ddY mice Open field test using caffeine and phenobarbital Repellent activity against <i>T. castaneum</i> Contact toxicity test: Adult fumigant toxicity test of <i>Sitophilus zeamais</i>	Topical Fumigation	2, 4, 6, 8, and 10 µl	of 0.04 and 0.4 mg Terpinolene (0.4 mg) antagonized caffeine-induced excitation, prolonging the sleep time of guinea pigs with outcomes comparable to those of chlorpromazine Weak repellent activity against <i>Tribolium castaneum</i> and <i>Sitophilus zeamais</i> Moderate contact toxicity (LC ₅₀ between 51.41 and 66.38 µg/mg) Strong fumigant toxicity against <i>S. zeamais</i> : LC ₅₀ = 1.30 (24 h), 0.86 (48 h), 0.67 (72 h), 0.37 (96 h) The article reports that terpinolene has repellent activity but does not report corresponding values. <i>Callosobruchus chinensis</i> The dose of 0.05 mg/cm ² caused 55% mortality, while the dose of 0.1 mg/cm ² caused 87% mortality <i>Sitophilus zeamais</i> 0.18 mg/cm ² : 52 to 72% mortality 0.26 mg/cm ² : 93% to 95% mortality. Fumigation in closed containers resulted in 100% mortality compared to the open container (2%).	Insecticide	(Wang et al., 2009)
Gu et al.	2009	Taiwan	Repellent activity against <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> Insecticide activity	Inhalation	1.92 µg/cm ²		Repellent	(Gu et al., 2009)
Park et al.	2003	South Korea		Fumigation	0.1 mg/cm ²		Insecticide	(Park et al., 2003)

used flavoring agents with significant biological activity (Felipe and Bicas, 2017), which has stimulated the development of studies aiming to characterize their pharmacological properties, as well as determining their potential applications for human benefit.

Terpenes have been acknowledged as efficient therapeutic alternatives in the treatment of numerous conditions in the Mediterranean, Ayurvedic, and Chinese Medicine, which represent millenary treatment systems based on the use of natural substances and spices following an evidence-based approach guided by traditional knowledge (Khan, 2014). Asian countries such as India and China have a vast and rich record of medicinal plants that have been scientifically validated and widely used by the population for the treatment of many diseases, corroborating the interest of their scientists in natural product research (Jamshidi-Kia et al., 2018). Despite the outstanding Brazilian biodiversity and the existence of populations where the traditional medicine culture is transmitted from generation to generation, the use of herbal medicines and related therapies by the general population is still under development, which is in part motivated by the growing difficulty of access to commercial medicines (Valli and Bolzani, 2019). Importantly, natural product research using species of the Brazilian biodiversity has identified a significant number of molecules with the potential to be used in drug development (Paduch et al., 2007).

The present review included preclinical studies performed either *in silico*, *in vitro*, and *in vivo*, in order to cover the therapeutic potential and other biological activities of terpinolene. Special attention should be given to the small number of computational tests (*in silico*), despite the fact that this type of study present advantages such as lower demand for physical resources, low execution cost, fast results, selection of new and likely targets based on machine learning, and potential for fingerprint-based molecular interaction (Agamah et al., 2020). However, only preclinical studies using *in vivo* animal models followed by clinical trials will provide consistent information regarding the pharmacokinetic parameters (including absorption, distribution, metabolism, and excretion) required during the stages of drug development (Jaroch et al., 2018). Next, we discuss the properties of terpinolene in sections organized according to the main biological activities reported in this review.

Toxicity and cytotoxicity

Insecticides are substances used to kill insects, which has a direct impact on human health due to the elimination of disease vectors. However, many of these agents are synthetic compounds that pollute the environment causing toxic effects to various organisms (Ansari et al., 2014; Beard et al., 2003). Thus, a growing number of researchers have searched for bioecological alternatives to combat vectors without causing environmental damage, among which plant-derived natural products stand out as promising insecticides (Ansari et al., 2014). In this context, studies have demonstrated the effectiveness of terpinolene in the elimination of disease vectors due both to its insecticide and larvicide properties (Monro, 1971).

Several of the pesticide categories (acaricides, fungicides, insecticides, herbicides, and larvicides) share properties reported for terpinolene in the present review (Coutinho et al., 2005). Accordingly, terpinolene was found to present toxic effects against a variety of organisms, especially against insects (Ali et al., 2015; Chang et al., 2012; do Nascimento et al., 2018; Liang et al., 2018; Liu et al., 2020; Park et al., 2003; Pavela et al., 2018; Ribeiro et al., 2020; Ribeiro et al., 2019; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2017, 2016), larvae (Ali et al., 2015; Cheng et al., 2009a, 2009b; Conti et al., 2012; da Silva et al., 2016; Kweka et al., 2016; Pavela, 2015; Perumalsamy et al., 2009), and mites (Born et al., 2018; Ribeiro et al., 2019a, 2019b). Studies have reported the insecticide effect of terpinolene against *Culex quinquefasciatus* (with lethal activity determined by LC₅₀ of 25.7 µl/l and LC₉₀ of 50.1 µl/l) (Pavela et al., 2018), *Bemisia tabaci* (2 µl/l) (Ribeiro et al., 2020), *Bacopa caroliniana* (20 µl/l) (Liu et al., 2020), *Rhyzopertha dominica* (5 µl/l) (do Nascimento et al., 2018), *Musca domestica* (1.25 µl/l) (Zhang et al.,

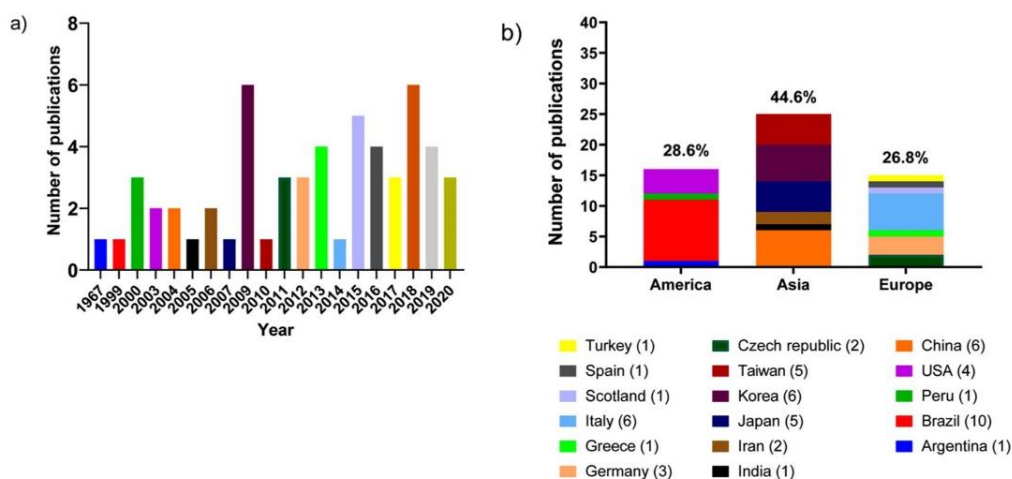


Fig. 3. (a) Number of publications per year; (b) Geographical distribution of publications are represented as the number and percentage of total publications.

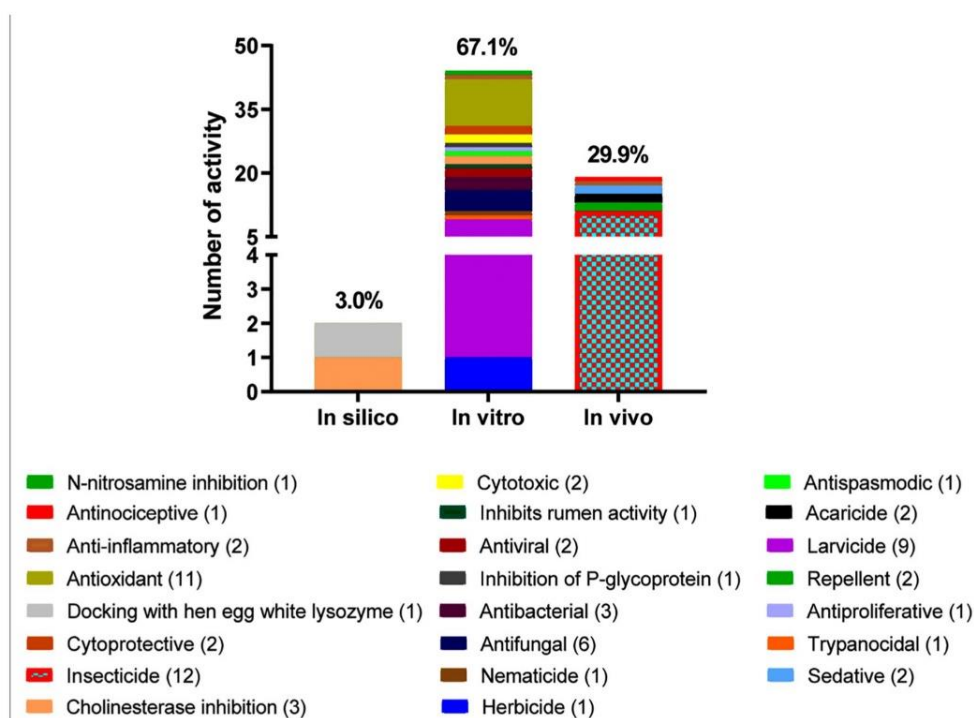


Fig. 4. Type of study vs. biological activity. Result are expressed as the number and percentage of publications reporting the corresponding biological activity.

2017), *Callosobruchus chinensis* (0.18 mg/cm²), and *Sitophilus oryzae* (0.05 mg/cm²) (Park et al., 2003), *Tribolium castaneum* and *Lipocelis bostrychophila* (Liang et al., 2018), *Drosophila melanogaster* (Zhang et al., 2016), *Aedes aegypti* (da Silva et al., 2016), *Anopheles quadrimaculatus* (Ali et al., 2015), *A. albopictus* (Cheng et al., 2009b; Conti et al., 2012; Gu et al., 2009), *Culex quinquefasciatus* (Pavela, 2015), *Anopheles gambia* (Kweka et al., 2016), *Culex pipens pallens*, and *Ochlerotatus Togo* (Perumalsamy et al., 2009) and *Blattella germanica* (Chang et al., 2012).

Corroborating the findings of the present review, literature data regarding the biological activities of other non-oxygenated monocyclic

monoterpenes presenting the same molecular mass as terpinolene indicate that they share comparable insecticidal activities, as demonstrated for limonene (Liang et al., 2018; Ribeiro et al., 2020). Additionally, p-cymene showed slightly higher toxicity than terpinolene against *Cx. quinquefasciatus* larvae (LC₅₀ of 20.6 µl/l e LC₉₀ µl/l = 25.8) (Pavela et al., 2018). Wang et al., (2009) demonstrated that like terpinolene, monoterpene terpinene presented a significant activity against *Sitophilus zeamais* (fumigant assay) and a study carried out by Chang et al. (2012), demonstrated the high toxicity of terpinolene, p-cymene, o-cymene, and m-cymene against *Blattella Germanica*.

Reference	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
RIBEIRO et al. (2020)	+	+	?	+	?	?	+	?	-	+
LUI et al. (2020)	-	+	?	+	?	?	?	?	+	+
RIBEIRO et al. (2019)a	+	+	?	+	?	+	?	?	+	+
RIBEIRO et al. (2019)b	+	+	?	+	?	+	+	?	+	+
DO NASCIMENTO (2018)	+	+	?	+	?	+	+	?	+	+
LIANG et al., (2018)	+	?	-	+	+	?	+	?	+	?
BORN et al., (2018)	+	+	-	+	?	+	?	?	?	+
ZHANG et al. (2017)	+	+	+	+	?	?	?	?	+	+
ZHANG et al. (2016)	+	+	?	+	?	?	+	?	+	+
MACEDO et al. (2016)	+	?	?	+	?	?	+	?	+	+
ALI et al. (2015)	+	+	?	+	?	?	?	?	+	+
ITO & ITO (2013)	+	+	-	?	?	?	-	?	+	+
CHANG et al. (2012)	+	+	?	+	?	?	?	?	+	+
ITO; ITO (2011)	+	+	-	?	?	?	-	?	?	+
WANG; LI & LEI (2009)	+	+	?	+	?	+	?	?	?	+
GU et al. (2009)	+	+	?	+	?	?	?	?	+	+
PARK et al., (2003)	+	+	?	+	?	+	-	?	+	+

Fig. 5. Risk of bias summary. Each included study was analyzed by the authors following judging questions (Q1-Q10) and classified according to their risk of bias. Yellow (?): unclear/uncertain risk of bias; red (-): high risk of bias; blue (+): low risk of bias. Q1: Was the allocation sequence adequately generated and applied?; Q2: Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?; Q3: Was the allocation to the different groups adequately concealed?; Q4: Were the animals randomly housed during the experiment?; Q5: Were the caregivers and/or investigators blinded from the knowledge of which intervention each animal received during the experiment?; Q6: Were the animals randomly selected for outcome assessment?; Q7: Was the outcome assessor-blinded?; Q8: Were incomplete outcome data adequately addressed?; Q9: Are the study reports free of selective outcome reporting?; Q10: Was the study apparently free of other problems that could result in a high risk of bias? (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

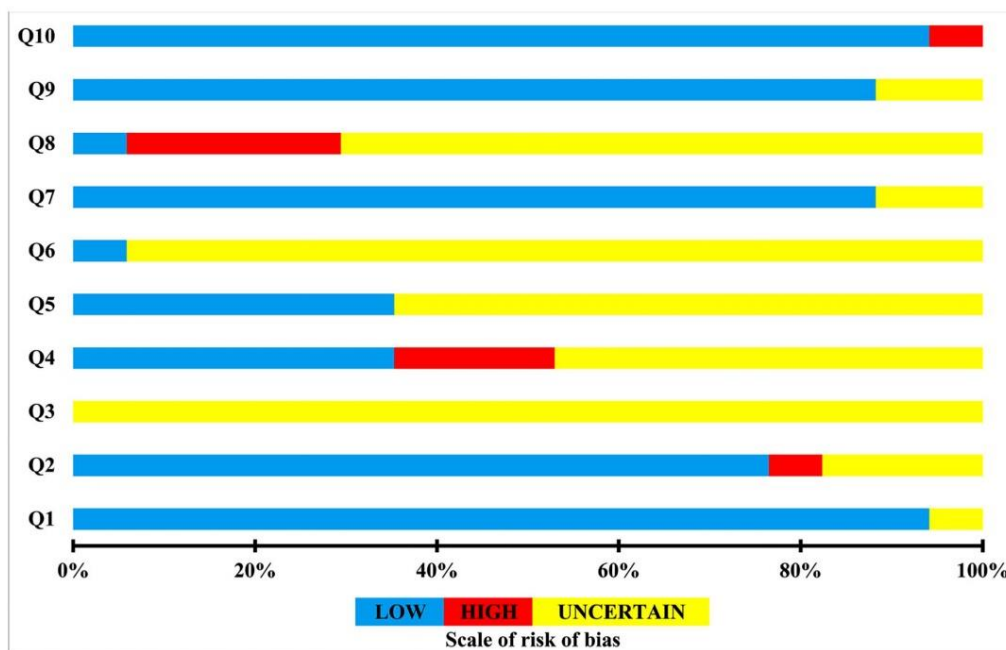


Fig. 6. The risk of bias scale indicates the proportion of articles that met each criterion.

Unlike the large number of *in vitro* studies, the acaricide potential of terpinolene using *in vivo* models remains poorly investigated. Nevertheless, this monoterpene proved to be efficient against *Tetranychus urticae* at concentrations ranging from 0.0002 µl/l (Born et al., 2018) to 0.2 µl/l (Ribeiro et al., 2019a, 2019b), which is comparable to results obtained with monoterpenes limonene and p-cymene against *Tetranychus urticae* (Born et al., 2018; Ribeiro et al., 2019).

Regarding the mechanisms of action underlying the insecticidal

activity of terpinolene, da Silva et al. (2016) demonstrated that this monoterpene interferes with the activity of L4 gut proteases, including trypsin-like enzymes (serine proteases are involved in insect digestion processes) of *A. aegypti* in addition to suggesting the involvement of acetylcholine-related mechanisms in the toxicity to several insect species.

When analyzing the influence of drug exposure reported in the studies, it was observed that the insecticidal effect of terpinolene is

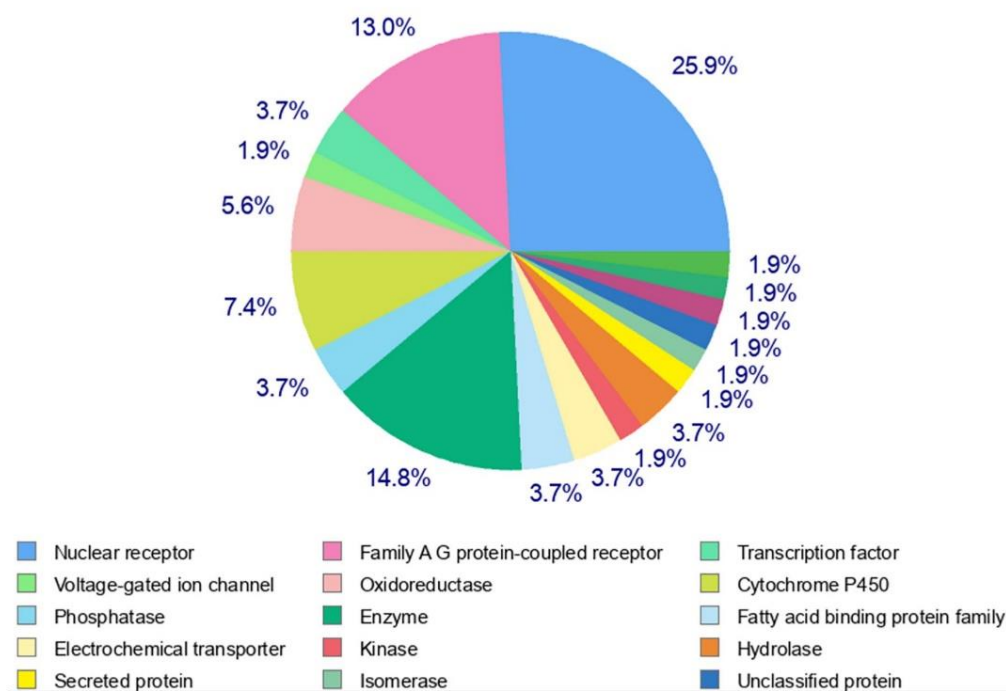


Fig. 7. Predicted molecular targets for terpinolene. This data was obtained using the Swiss TargetPrediction computational tool.

influenced by the time of exposure (tending to decrease the effect over the course of hours), method of exposure (inhalation/vapor action seemed to be, comparatively, the most effective), and environmental conditions (closed environments drastically increase the insecticidal action). Therefore, it is believed that increased exposure in closed environments, for a shorter time and in a way that facilitates exposure to this airborne route tends to optimize the desired toxicity. Also, studies have demonstrated that terpinolene's insecticide potential is associated with its volatility and power of induction of cell death by mitochondrial apoptosis and ROS generation causing oxidative stress (Monro, 1971). Together, these findings suggest that terpinolene could be used in the development of anti-vector products.

The cytotoxic profile of terpinolene has been investigated and characterized on human cells (Aydin et al., 2013; de Christo Scherer et al., 2019; Morshedi et al., 2014; Turkez et al., 2015) in order to determine its *in vitro* safety, as well as assess its potential therapeutic uses, e.g. against cancer. Accordingly, our target prediction study identified the Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS (which has been shown to play key roles in signal transduction and cellular communication, as well as is associated with a variety of cancers) as a potential target for terpinolene, suggesting that this compound could have beneficial roles in cancer. This is corroborated by previous research demonstrating that the monoterpene, at concentrations above 50 mg/L, has antiproliferative activity against neuroblastoma cells (N2a) (Aydin et al., 2013), which is possibly related to the inhibition of n-nitrosamine (*in silico*) (Sawamura et al., 1999). Blood cells treated with terpinolene at concentrations ranging from 150 mg/L to 200 mg/L released increased levels of LDH, indicating that the compound is toxic at this concentration range (Turkez et al., 2015). On the other hand, terpinolene presented a cytoprotective profile in PC12 (Rat pheochromocytoma) cells (Morshedi et al., 2014) and failed to induce significant cytotoxic effects against L929 fibroblasts and RAW macrophages cells (de Christo Scherer et al., 2019).

Interestingly, terpinolene caused a marked increase in intracellular

production of ROS in cancer cells, resulting in increased expression of apoptotic markers such as the BCL2-associated X protein (BAX), Poly ADP (Adenosine Diphosphate)-Ribose Polymerase (cleaved-PARP), and pro-caspase-8 without promoting genotoxic effects (Kig et al., 2021). Another study, using the unicellular organism *Schizosaccharomyces pombe* showed that terpinolene toxicity was correlated with oxidative stress and reduction of the mitochondrial transmembrane potential (Agus et al., 2018).

Antioxidant activity

In this review, a total of 11 scientific studies reported the *in vitro* antioxidant activity of terpinolene (Aydin et al., 2013; Choi et al., 2000; de Christo Scherer et al., 2019; Dorman et al., 2000; Emami et al., 2011; Grassmann et al., 2003; Graßmann et al., 2005; Kim et al., 2004; Lu et al., 2019; Ruberto and Baratta, 2000; Turkez et al., 2015), most of which through the elimination of the DPPH free radical, inhibition of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) (Dorman et al., 2000; Lu et al., 2019; Ruberto and Baratta, 2000), and inhibition of LDL oxidation (Grassmann et al., 2003; Graßmann et al., 2005). Studies have shown high terpinolene concentrations have a protective role against oxidative stimuli by increasing the total antioxidant capacity via induction of Akt1 expression. However, the study of Boulebd (2021) demonstrated that the hydroperoxyl radical scavenging activity exhibited by terpinolene is strongly influenced by the environment, which at least in part, explains the balance between ROS generation and the antioxidant capacity of terpinolene (Boulebd, 2021).

A study by Lu et al. (2019) demonstrated that terpinolene concentration-dependently promoted a reduction of total oxidant levels and an increase in the antioxidant substances, which was comparable to the effectiveness of butylated hydroxytoluene (positive control used) based on the results obtained using the DPPH and TBARS methods. The same study also demonstrated that monoterpene γ -terpinene inhibited lipid peroxidation to the same extent as terpinolene (over 80%

inhibition, comparable to the standard antioxidant control). On the other hand, the monoterpene (+)-limonene exhibited no significant activity when evaluated through different methods, i.e., exhibited low DPPH radical-scavenging ability, low protective capacity against lipid from oxidation (Emami et al., 2011).

Free radicals such as reactive oxygen species (ROS) are naturally produced in various organisms, both at normal physiological conditions and stressful situations (Dallaqua and Damasceno, 2011; Halliwell and Gutteridge, 2015). However, it has been consistently demonstrated that pathological ROS generation is associated with the development of chronic diseases, as observed in Alzheimer's (Mecocci et al., 1994), which has stimulated the discovery of antioxidant substances capable of inhibiting the generation or neutralizing the effects of free radicals (Halliwell and Gutteridge, 2015). Given the significance of its antioxidant activity, it is assumed that terpinolene can be a potential drug candidate for the treatment of pathological processes caused by oxidative stress.

Antimicrobial activities

According to the consulted literature, terpinolene has antimicrobial activities such as a parasite, antifungal, antibacterial, virucide, and trypanocide. In this context, terpinolene showed activity against *Trypanosoma brucei* with an $EC_{50} = 0.035 \mu\text{g/ml}$ ($0.26 \mu\text{M}$), similar to effect observed for the non-oxygenated monoterpene limonene (Ngahang Kamte et al., 2018). Its fungicidal effects were demonstrated in studies with *Leptographium abietinum* (Davis et al., 2018), *Candida tropicalis* (32 mg/ml), *C. utilis* (8 mg/ml), *C. albicans* (at concentrations above 32 mg/ml), *Botrytis cinerea*, and *Sclerotium cepivorum*. Importantly, evidence has indicated that the mechanism of action underlying terpinolene effects involves direct damage to the fungal membrane and organelles (Pontin et al., 2015; Shin, 2004; Yu et al., 2015). Additionally, Pinto et al. (2020) showed the interference of terpinolene in the plasma membrane of the fungus *Microsporium canis* LM216 (dermatophytes fungi strains) promoting cytotoxicity mechanisms associated to increased K^+ influx.

Regarding the antibacterial effects of terpinolene, studies have demonstrated that this monoterpene inhibited the growth of *Microcystis aeruginosa* (at concentrations above 1079 mM), a harmful freshwater cyanobacteria of economic and ecological importance (Zhao et al., 2020). Lee et al. (2013). Furthermore, the compound demonstrated its effectiveness against *Propionibacterium acnes* and *S. aureus*, which are important causative agents of skin infections. The compared the effectiveness of other terpenes, were observed that alfa-terpinene and limonene showed a moderate antibacterial action, while p-cymene exhibited low antibacterial activity.

Interestingly, while Kim et al. (2006) stated that terpinolene showed little or no significant effect against *B. bifidum*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *E. coli*, and *C. perfringens*, Ngan et al. (2012) found intense antibacterial activity against the same strains, except for *E. coli*. However, since no MIC value for terpinolene was reported in the work of Kim et al. (2006), a complete interpretation of their results is not possible. Finally, in addition to being active against nine enteric pathogenic bacteria (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *C. perfringens*, *C. paraputrificum*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *C. difficile*, *C. butyricum*, and *S. aureus*), terpinolene inhibited the growth acidophilic bacteria playing important roles on the intestinal flora balance such as *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei* (Ngan et al., 2012).

Terpinolene was found to cause inhibition of photosynthesis and nitrogen metabolism through the enzymatic inhibition of nitrate reductase and glutamine synthetase, in addition to inducing the oxidative stress of the algae *Microcystis aeruginosa* (Zhao et al., 2020).

Finally, consistent evidence has demonstrated the antiviral properties of this monoterpene against influenza A virus, PR8 subtype H1N1, Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2), Echovirus 9 (Hill

strain), Poliovirus 1 (Sabin strain), Coxsackievirus B1 and Adenovirus 2. For the influenza A/PR/8 virus subtype H1N1, this compound showed antiproliferative effects, without however inhibiting neuraminidase expression or virus fixation in the cells (Garozzo et al., 2011, 2009).

Other pharmacological effects

Among the less reported activities, terpinolene was found to induce a fibrinolytic effect by apparent disruption of fibrillation formation in hen egg white lysozyme (HEWL), corroborating with the finding that p-cymene presented similar effect, decreasing the ThT fluorescence intensity. On the other hand, limonene was found to induce fibrillation and increased ThT fluorescence intensity by more than 50% (Morshedi et al., 2014). Terpinolene can inhibit P-glycoprotein (P-gp)-mediated transport and interact with P-gp substrates during intestinal absorption processes, which is also observed for alpha-terpinene (Yoshida et al., 2006).

Terpinolene was also found to inhibit acetylcholinesterase (AChE) *in silico* (Politi et al., 2017), *in vitro* (Bonesi et al., 2010) e *in vivo* (IC_{50} values $< 10 \mu\text{l/ml}$) (Liu et al., 2020), in addition to inhibiting butyrylcholinesterase (BChE) *in vitro* (Bonesi et al., 2010). Comparable results were demonstrated by limonene with regard to the inhibition of AChE ($IC_{50} = 225.9$) and BChE ($IC_{50} = 456.2$) (Menichini et al., 2009). Other monoterpenes, including p-cymene, γ -terpinene, (+)-limonene, and (-)-limonene inhibited AChE activity by 30% to 40% (Miyazawa et al., 1997). Importantly, it has been suggested that compounds with anti-AChE activity have the potential to be used in the development of a drug against Alzheimer's Disease (Seifi Nahavandi et al., 2020).

Previous research demonstrated that terpinolene has anti-inflammatory and antinociceptive effects that are related to interference with serotonergic pathways in the central nervous system (CNS). It was proposed that the mechanisms underlying these effects involve inhibition of serotonin receptors (5HT-2A) (Macedo et al., 2016), as demonstrated by an increase in the mechanical threshold (as measured by Randall Selitto paw pressure test) (Macedo et al., 2016). Other proposed mechanisms are the interaction with 5HT-3 receptor channels (expressed in an adrenergic cell line N1E-115) and the inhibition of calcium influx inhibition via GABA-mediated signaling (Riyazi et al., 2007).

A study by Ito and Ito (2011) demonstrated that the monoterpene showed an effect similar to that chlorpromazine, prolonging the pentobarbital-induced sleep time through an antagonistic action in dopaminergic, noradrenergic, and serotonin neurons. A study by Koyama and Heinbockel (2020) suggested that the mechanisms of action of essential oils and terpenes are intrinsically related to their multiple roles in the olfactory/respiratory system (Kobayakawa et al., 2007; Mori and Sakano, 2011; Soria-Gómez et al., 2014). Accordingly, a clinical study of terpinolene found significantly reduced tension, enhanced relaxation, and stable states of brain function following the treatment, especially in prefrontal regions, which is possibly due to the modulation of olfactory receptors, one of the largest families of G-protein-coupled receptors (Sowndhararajan et al., 2015).

This systematic review is a pioneering study listing the different properties of terpinolene in a biological context. The *in vivo* trials that compose this study had their risk of bias analyzed to determine the reliability of their methods. It is worth mentioning that *in vivo* methods are crucial for the evaluation of pharmacokinetic (e.g., absorption, metabolism, bioavailability) and pharmacodynamic (e.g., potency, affinity, selectivity) parameters, as well as to elucidate the cellular and biochemical events underlying the mechanism of action of a given compound such as gene transcription, protein expression, mediator product and other metabolic changes associated to disease status. Finally, with regard to the biological properties of terpinolene, this review highlights its insecticidal and antioxidant effects as the most promising activities demonstrated through preclinical studies. Other terpinolene properties, such as cytotoxicity, genotoxicity, and oxidative

potential are discussed in conformity with the corresponding literature.

In general, terpenes are capable of inducing ROS generation, contributing to lipid peroxidation, oxidative damage, and increased cytotoxic markers. Here, we suggest that the prooxidant and cytotoxic effects of terpenes could be explored in drug development in the context of anticancer and antiparasitic research. On the other hand, the antioxidant activity of terpinolene are directly linked to its cytoprotective effects, which could be useful in preventing cell damage caused by oxidative stress (mediated by both ROS and RNS), as well as having potential beneficial effects on neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. Accordingly, evidence raised by the present study indicates that terpinolene may have a wide range of pharmacological effects.

Finally, before the small number of preclinical trials reporting the pharmacokinetic profile of terpinolene, we encourage the development of research addressing this issue. Although some studies have mentioned the possibility of using terpinolene in the production of food, insecticides, and medicines, given the lack of scientific data proving its effectiveness, this theme deserves further investigation through *in vivo* and clinical studies.

Materials and methods

A systematic review was carried out according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) and the Cochrane Handbook for Systematic Reviews guidelines. The systematic review protocol used in this aim was registered at the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO).

Strategy of research

Bibliographic research was conducted in four electronic databases: Embase, Medline/PubMed, Scopus, and Web of Science. In each database, different combinations of the following descriptors were used: terpinolene "AND" activity "OR" properties "OR" therapeutic "OR" treatment. All manuscripts published in English from 1960 to 12 September 2020 were considered and analyzed according to the other steps of the review.

Inclusion and exclusion criteria

The following inclusion criteria were adopted: (1) articles using *in silico*, *in vitro*, or *in vivo* methods, (2) the intervention was performed using only terpinolene as a treatment, (3) the control group was placebo or non-exposed control group, (4) the articles should discuss the biological activity of terpinolene, and (5) only primary (original) papers were considered.

The following criteria were used to exclude articles: (1) papers showing only clinical studies, (2) articles presenting mixtures of compounds whose activity was not attributed to terpinolene alone, (3) manuscripts published in other language except English, portuguese and espanhol, (4) articles with unavailable full texts, (5) articles without the selected descriptors, (6) duplicated studies, and (7) review articles.

Selection of studies

The first step of our work was to conduct a search in the electronic databases using the selected descriptors. The list of articles containing full information (title, abstract, and keywords) was downloaded (specific programs were not used for the screening of articles), duplicates were removed, and inclusion and exclusion criteria were applied by independent researchers (IOM and JRS) using the PRISMA guidelines to assess the eligibility criteria for each article. Any divergence in the selection of eligible studies was resolved by consensus. The articles selected in the initial screening, as well as those whose preliminary analysis left doubts, had the full texts analyzed and documented in a PRISMA flowchart.

Data extraction and analysis

Data extraction was carried out by two researchers (IOM and JRS) independently using a predetermined extraction table, and disagreements were resolved by consensus. The reported activities are subdivided into *in silico*, *in vitro*, and *in vivo*. For each subgroup, a table was elaborated with information on (1) authors, (2) year, (3) country, (4) method, (5) administration route, (6) dose and/or concentration tested, (7) main results, and (8) biological activity. For each table, the compatible extraction data for each type of study was addressed.

Prediction of biological activity profiles

The SwissTargetPrediction online tool (<http://swisstargetprediction.ch/>) was used to predict small molecules working as potential targets for terpinolene according to their 2D or 3D similarity with the ligand.

Evaluation of the methodological quality of the study/risk of bias

The risk of bias and methodological quality of the selected *in vivo* studies (non-human animals) were manually analyzed by two researchers (IOM and JRS) independently using the SYRCL's Risk of Bias (RoB) methodology (Hooijmans et al., 2014) and the final validation of the risk assessment was performed by two independent researchers using the kappa index. This tool was not used to analyze *in vitro* or *in silico* studies since there is no validated tool for this type of research. After the analysis, the studies were classified into the following categories: "low risk of bias", "high risk of bias" and "clear risk of bias".

Data synthesis

The results were presented through a narrative synthesis since it was not possible to conduct a meta-analysis due to the great heterogeneity of the studies addressed in this review.

Conclusions

Our analysis of the literature revealed that most studies addressing the biological activities of terpinolene were conducted using *in vitro* tests. However, it is observed that the *in vivo* assays describe in more detail its biological properties at the molecular level, which is useful for elucidating the mechanisms of action of this monoterpene. According to the studies presented in this review, terpinolene is an isolated compound with the potential to be used in the development of commercial formulations with repellent effects as well in the composition of insecticides, both as the active principle or as an adjuvant. It is worth mentioning, however, that terpinolene has a series of pharmacological effects that need to be better investigated to establish its potential therapeutic applications, as well as the mechanisms underlying its biological actions. Thus, future research should consider exploring the possibility of new studies *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies for therapeutic applications of this compound with a better perspective in understanding its potential benefits to human health.

Funding

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES), Cearense Foundation to Support Scientific and Technological Development (FUNCAP) - finance code BPI, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - finance code 304291/2017-0, and Financier of Studies and Projects - Brasil (FINEP). This article is a contribution of the National Institute of Science and Technology - Ethnobiology, Bioprospecting and Nature Conservation/CNPq/FACEPE.

CRedit authorship contribution statement

Isis Oliveira Menezes: Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Jackelyne Roberta Scherf:** Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision. **Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins:** Writing – review & editing, Supervision. **Andreza Guedes Barbosa Ramos:** Writing – review & editing, Supervision. **Jullyana de Souza Siqueira Quintans:** Writing – review & editing, Supervision. **Henrique Douglas Melo Coutinho:** Writing – review & editing, Supervision. **Jaime Ribeiro-Filho:** Writing – original draft, Writing – review & editing. **Irwin Rose Alencar de Menezes:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Brazilian agencies CNPq, CAPES and Funcap, and the support of the Regional University of Cariri (URCA).

References

- Agamah, F.E., Mazandu, G.K., Hassan, R., Bope, C.D., Thomford, N.E., Ghansah, A., Chimusa, E.R., 2020. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Brief. Bioinform.* 21, 1663–1675. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz103>.
- Agus, H.H., Sarp, C., Cemiloglu, M., 2018. Oxidative stress and mitochondrial impairment mediated apoptotic cell death induced by terpinolene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicol. Res.* 7, 848–858. <https://doi.org/10.1039/C8TX00100F> (Camb).
- Ali, A., Tabanca, N., Ozek, G., Ozek, T., Aytac, Z., Bernier, U.R., Agramonte, N.M., Baser, K.H.C., Khan, I.A., 2015. Essential oils of *Echinophora lamondiana* (apiaceae: umbelliferae): a relationship between chemical profile and biting deterrence and larvicidal activity against mosquitoes (diptera: culicidae). *J. Med. Entomol.* 52, 93–100. <https://doi.org/10.1093/jme/tju014>.
- Ansari, M.S., Moraiet, M.A., Ahmad, S., 2014. Insecticides: impact on the environment and human health. *Environmental Deterioration and Human Health*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 99–123. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7890-0_6.
- Aydin, E., Turkez, H., Tasdemir, S., 2013. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 64, 415–424. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Beard, J., Sladden, T., Morgan, G., Berry, G., Brooks, L., McMichael, A., 2003. Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. *Environ. Health Perspect.* 111, 724–730. <https://doi.org/10.1289/EHP.5885>.
- Bebarta, V., Luyten, D., Heard, K., 2003. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results? *Acad. Emerg. Med.* 10, 684–687. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2003.tb00056.x>.
- Bonesi, M., Menichini, F.F., Tundis, R., Loizzo, M.R., Conforti, F., Passalacqua, N.G., Statti, G.A., Menichini, F.F., 2010. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 25, 622–628. <https://doi.org/10.3109/14756360903389856>.
- Born, F.S., da Camara, C.A.G., de Melo, J.P.R., de Moraes, M.M., 2018. Acaricidal property of the essential oil from *Lippia gracilis* against *Tetranychus urticae* and a natural enemy, *Neoseiulus californicus*, under greenhouse conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 75, 491–502. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0286-3>.
- Bosc, N., Atkinson, F., Felix, E., Gaulton, A., Hersey, A., Leach, A.R., 2019. Large scale comparison of QSAR and conformal prediction methods and their applications in drug discovery. *J. Cheminform.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13321-018-0325-4>.
- Boulebd, H., 2021. Are thymol, rosefuran, terpinolene and umbelliferone good scavengers of peroxy radicals? *Phytochemistry* 184, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112670>.
- Casanova, L.M., Costa, S.S., 2017. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. *Rev. Virtual Quim.* 9, 575–595.
- Chang, K.S., Shin, E.H., Park, C., Ahn, Y.J., 2012. Contact and fumigant toxicity of *Cyperus rotundus* steam distillate constituents and related compounds to insecticide-susceptible and -resistant *blattella germanica*. *J. Med. Entomol.* 49, 631–639. <https://doi.org/10.1603/ME11060>.
- Cheng, S.S., Chang, H.T., Lin, C.Y., Chen, P.S., Huang, C.G., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009a. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Pest Manag. Sci.* 65, 339–343. <https://doi.org/10.1002/ps.1693>.
- Cheng, S.S., Chua, M.T., Chang, E.H., Huang, C.G., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009b. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresour. Technol.* 100, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.060>.
- Choi, H.S., Sun Song, H., Ukeda, H., Sawamura, M., 2000. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4156–4161. <https://doi.org/10.1021/jf000227d>.
- Claassen, V., 2013. *Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscience Research: Biopharmaceutics, Animal Characteristics, Maintenance, Testing Conditions*. Elsevier.
- Compound report card, 2021. Compound report card [WWW document] n.d. URL https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL454697/ (accessed 7.13.21).
- Conti, B., Benelli, G., Flamini, G., Cioni, P.L., Profeti, R., Ceccarini, L., Macchia, M., Canale, A., 2012. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 110, 2013–2021. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2730-8>.
- Coutinho, C.F.B., Tanimoto, S.T., Galli, A., Garbellini, G.S., Takayama, M., do Amaral, R. B., Mazo, L.H., Avaca, L.A., Machado, S.A.S., 2005. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxicidade. *Pestic. Rev. ecotoxicologia e meio Ambient.* 15, 65–72.
- da Silva, M.F.R., Bezerra-Silva, P.C., de Lira, C.S., de Lima Albuquerque, B.N., Agra Neto, A.C., Pontual, E.V., Maciel, J.R., Paiva, P.M.G., Navarro, D.M., do, A.F., 2016. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Exp. Parasitol.* 165, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.017>.
- Dallaqua, B., Damasceno, D.C., 2011. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13, 367–373. <https://doi.org/10.1590/s1516-05722011000300017>.
- Davis, T.S., Horne, F.B., Yetter, J.C., Stewart, J.E., 2018. Engelmann spruce chemotypes in colorado and their effects on symbiotic fungi associated with the North American spruce beetle. *J. Chem. Ecol.* 44, 601–610. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0961-1>.
- de Christo Scherer, M.M., Marques, F.M., Figueira, M.M., Peisino, M.C.O., Schmitt, E.F. P., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2019. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress *in vitro*. *J. Tissue Viabil.* 28, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.02.003>.
- do Nascimento, A.F., da Camara, C.A.G., de Moraes, M.M., 2018. Fumigant activity of *schinus terebinthifolius* essential oil and its selected constituents against *rhizophorpha dominica*. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 71, 8359–8366. <https://doi.org/10.15446/rfna.v71n1.62743>.
- Domnan, H.J.D., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Deans, S.G., 2000. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.* 15, 12–16.
- Emami, S.A., Asili, J., Malekian, M., Hassanzadeh, M.K., 2011. Antioxidant effects of the essential oils of different parts of *platycladus orientalis* L. (franco) and their components. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 14, 334–344. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643943>.
- Famiani, F., Rischer, H., Osorio, S., Es, S., Vallarino, J.G., Pott, D.M., 2019. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Front. Plant Sci.* 10, 835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>.
- Felipe, I.O., Bicas, J.L., 2017. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Quím. Nova na Esc.* 39, 120–130.
- Garozzo, A., Timpanaro, R., Bisignano, B., Furneri, P.M., Bisignano, G., Castro, A., 2009. In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 806–808. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02740.x>.
- Garozzo, A., Timpanaro, R., Stivala, A., Bisignano, G., Castro, A., 2011. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: study on the mechanism of action. *Antivir. Res.* 89, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.11.010>.
- Gasiński, A., Kawa-Rygielska, J., Szumny, A., Czubaszek, A., Gąsior, J., Pietrzak, W., 2020. Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera Indica*). *Molecules* 25, 3033.
- Geris, L., 2014. Regenerative orthopaedics: *in vitro*, *in vivo* ... *in silico*. *Int. Orthop.* 38, 1771–1778. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2419-6>.
- Ghasemi, Y., Mohagheghzadeh, A., Moshavash, M., Ostovan, Z., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H., Ghoshoon, M.B., Raei, M.J., Mosavi-Azami, S.B., 2009. Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1301.
- Graßmann, J., Hippeli, S., Spitzenberger, R., Elstner, E.F., 2005. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine* 12, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.005>.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Vollmann, R., Elstner, E.F., 2003. Antioxidative properties of the essential oil from *pinus mugo*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7576–7582. <https://doi.org/10.1021/jf030496e>.
- Gu, H.J., Cheng, S.S., Lin, C.Y., Huang, C.G., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009. Repellency of essential oils of *cryptomeria japonica* (Pinaceae) against adults of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). *J. Agric. Food Chem.* 57, 11127–11133. <https://doi.org/10.1021/jf902448e>.

- Guimarães, A.G., Quintans, J.S.S., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phyther. Res.* 27, 1–15.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. In: *Radicals in Biology and Medicine*, 5th ed. ed, Free. Oxford University Press, Oxford. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- Higgins, J.P.T., Altman, D.G., Getzsch, P.C., Jüni, P., Moher, D., Oxman, A.D., Savović, J., Schulz, K.F., Weeks, L., Sterne, J.A.C., 2011. The Cochrane collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* 343, d5928.
- Hooijmans, C.R., Rovers, M.M., De Vries, R.B.M., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., Langendam, M.W., 2014. SYRCL's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
- Ito, K., Ito, M., 2011. Sedative effects of vapor inhalation of the essential oil of *Microtoena patchoulii* and its related compounds. *J. Nat. Med.* 65, 336–343. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0502-x>.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini Khoei, H., 2018. Medicinal plants: past history and future perspective. *J. Hermed Pharmacol.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>.
- Jaroach, K., Jaroach, A., Bojko, B., 2018. Cell cultures in drug discovery and development: the need of reliable *in vitro-in vivo* extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.023>.
- Johnston, N., Nevalainen, T., 2010. Impact of the Biotic and Abiotic Environment on Animal Experiments. In: Hau, J., Schapiro, S.J. (Eds.), *Handbook of Laboratory Animal Science*, Volume I, Third Edition. CRC Press, London, pp. 343–368. <https://doi.org/10.1201/b10416-13>.
- Julio, L.F., González-Coloma, A., Burillo, J., Diaz, C.E., Andrés, M.F., 2017. Nematicidal activity of the hydroalate byproduct from the semi industrial vapor pressure extraction of domesticated *Artemisia absinthium* against *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection* 94, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.12.002>.
- Keeling, C.I., Bohlmann, J., 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170, 657–675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x>.
- Khan, H., 2014. Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* 19, 216–219. <https://doi.org/10.1177/2156587214533346>.
- Kig, C., Mertoglu, E., Caliskan, A., Hincal Agus, H., Onay Ucar, E., Guler, V., 2021. Selective and oxidative stress-mediated cell death of MCF-7 cell line induced by terpinolene. *Biologia* 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00803-Z>.
- Kim, H.J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H.Y., Jin, Z., 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2849–2854. <https://doi.org/10.1021/jf035377d>.
- Kim, H.G., Cho, J.H., Jeong, E.Y., Lim, J.H., Lee, S.H., Lee, H.S., 2006. Growth-inhibiting activity of active compound isolated from *Terminalia chebula* fruits against intestinal bacteria. *J. Food Prot.* 69, 2205–2209. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2205>.
- Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H., 2007. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503–508. <https://doi.org/10.1038/nature06281>.
- Koyama, S., Heinbockel, T., 2020. The effects of essential oils and Terpenes in relation to their routes of intake and application. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1558. <https://doi.org/10.3390/ijms21051558>.
- Kroymann, J., 2011. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>.
- Kweka, E.J., Lima, T.C., Marciale, C.M., de Sousa, D.P., 2016. Larvicidal efficacy of monoterpenes against the larvae of *Anopheles gambiae*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.03.001>.
- Lee, C.J., Chen, L.W., Chen, L.G., Chang, T.L., Huang, C.W., Huang, M.C., Wang, C.C., 2013. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *J. Food Drug Anal.* 21, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.007>.
- Liang, J.Y., Guo, S.S., Zhang, W.J., Geng, Z.F., Deng, Z.W., Du, S.S., Zhang, J., 2018. Fumigant and repellent activities of essential oil extracted from *Artemisia dubia* and its main compounds against two stored product pests. *Nat. Prod. Res.* 32, 1234–1238. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1331227>.
- Liu, T.T., Chao, L.K.P., Hong, K.S., Huang, Y.J., Yang, T.S., 2020. Composition and insecticidal activity of essential oil of *Bacopa caroliniana* and interactive effects of individual compounds on the activity. *Insects* 11. <https://doi.org/10.3390/insects11010023>.
- Lu, Q., Huang, N., Peng, Y., Zhu, C., Pan, S., 2019. Peel oils from three *Citrus* species: volatile constituents, antioxidant activities and related contributions of individual components. *J. Food Sci. Technol.* 56, 4492–4502. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03937-w>.
- Macedo, E.M.A., Santos, W.C., Sousa Neto, B.P., Lopes, E.M., Piauillino, C.A., Cunha, F.V.M., Sousa, D.P., Oliveira, F.A., Almeida, F.R.C., 2016. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165103>.
- Mademtzoglou, D., Pavlidou, T., Bazioti, M.G., Koutsonikou, C., Lioulia, E., Akmoutsou, P., Drosopoulou, E., Vokou, D., Mavragani-Tsipidou, P., 2013. Assessment of the genotoxic potential of essential oil constituents by the *Drosophila* wing spot test. *Flavour and Fragrance Journal* 28, 188–194. <https://doi.org/10.1002/ffj.3157>.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Beal, M.F., 1994. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 36, 747–751. <https://doi.org/10.1002/ana.410360510>.
- Menichini, Federica, Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Marrelli, M., Statti, G.A., Menichini, Francesco, Conforti, F., 2009. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V. Brigg. (Apiaceae). *Fitorapia* 80, 297–300. <https://doi.org/10.1016/j.fitore.2009.03.008>.
- Miyazawa, M., Watanabe, H., Kameoka, H., 1997. Inhibition of Acetylcholinesterase activity by Monoterpenoids with a p-Menthane Skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 45, 677–679. <https://doi.org/10.1021/jf960398b>.
- Monro, H.A.U., 1971. *Manual of fumigation for insect control*. Anzeiger für Schädlingskd. und Pflanzenschutz 44, 176. <https://doi.org/10.1007/BF02026755>.
- Mori, K., Sakano, H., 2011. How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 467–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>.
- Morshedi, D., Kesenjini, T.S., Aliakbari, F., Karani-Osboo, R., Shakibaie, M., Marvian, A.T., Khalifeh, M., Soroosh, M., 2014. Identification and characterization of a compound from *Cuminum cyminum* essential oil with antifibrillation and cytotoxic effect. *Res. Pharm. Sci.* 9, 431–443.
- Ngahang Kamte, S.L., Ranjbarian, F., Cianfaglione, K., Sut, S., Dall'Acqua, S., Bruno, M., Afshar, F.H., Iannarelli, R., Benelli, G., Cappellacci, L., Hofer, A., Maggi, F., Petrelli, R., 2018. Identification of highly effective antityrosinase compounds in essential oils from the Apiaceae family. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.032>.
- Ngan, L.T.M., Moon, J.K., Kim, J.H., Shibamoto, T., Ahn, Y.J., 2012. Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1575–1583. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0961-6>.
- Oh, H.K., Sakai, T., Jones, M.B., Longhurst, W.M., 1967. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Applied microbiology* 15, 777–784. <https://doi.org/10.1128/AM.15.4.777-784.1967>.
- Opdyke, D.L.J., 1976. Terpinolene. *Food Cosmet. Toxicol.* 14, 877–878. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(76\)80163-0](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(76)80163-0).
- Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1> (Warsz).
- Park, I.K., Lee, S.G., Choi, D.H., Park, J.D., Ahn, Y.J., 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 39, 375–384. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00030-9).
- Pavela, R., 2015. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitol. Res.* 114, 3835–3853.
- Pavela, R., Maggi, F., Cianfaglione, K., Bruno, M., Benelli, G., 2018. Larvicidal activity of essential oils of five apiaceae taxa and some of their main constituents against *Culex quinquefasciatus*. *Chem. Biodivers.* 15, e1700382. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700382>.
- Perumalsamy, H., Kim, N.J., Ahn, Y.J., 2009. Larvicidal activity of compounds isolated from *asarum heterotropoides* against *Culex pipiens* pallens, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 46, 1420–1423. <https://doi.org/10.1603/033.046.0624>.
- Petrović, G.M., Stamenković, J.G., Mitić, V.D., Stojanović, G.S., Zlatković, B.K., Jovanović, O.C., 2018. Chemical composition and antioxidant activity of the *Athamanta turbitis* ssp. *haynaldii* volatiles. *Nat. Prod. Commun.* 13, 1934578X1801300634.
- Pinto, Á.V., Oliveira, J.C., Costa de Medeiros, C.A., Silva, S.L., Pereira, F.O., 2020. Potential of antifungal activity of terbinafine by dihydrojasmon and terpinolene against dermatophytes. *Lett. Appl. Microbiol. Immun.* 13371. <https://doi.org/10.1111/lam.13371>.
- Politi, F.A.S., Nascimento, J.D., da Silva, A.A., Moro, L.J., Garcia, M.L., Guido, R.V.C., Pietro, R.C.L.R., Godinho, A.F., Furlan, M., 2017. Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on common bed bug *Cimex lectularius* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1. *Parasitol. Res.* 116, 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5305-x>.
- Pontin, M., Bottini, R., Burba, J.L., Piccoli, P., 2015. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. *Phytochemistry* 115, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.003>.
- Ribeiro, N.C., da Camara, C.A.G., de Melo, J.P.R., de Moraes, M.M., 2020. Insecticidal potential of citrus and mango essential oils and selected constituents on silverleaf whitefly1. *Rev. Caatinga* 33, 90–99. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n110rc>.
- Ribeiro, N.C., da Camara, C.A.G., de Melo, J.P.R., de Moraes, M.M., 2019a. Effect of the essential oil from the latex of the fruit *Mangifera indica* L. on tetranychus urticae koch (acaritetranychidae). *Acarologia* 59, 335–347. <https://doi.org/10.24349/acarologia/20194333>.
- Ribeiro, N.C., da Camara, C.A.G., de Melo, J.P.R., de Moraes, M.M., 2019b. Acaricidal properties of essential oils from agro-industrial waste products from citrus fruit against *Tetranychus urticae*. *J. Appl. Entomol.* 143, 731–743. <https://doi.org/10.1111/jen.12642>.
- Riyazi, A., Hensel, A., Bauer, K., Geißler, N., Schaff, S., Verspohl, E., 2007. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT₃ receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum. *Planta Med.* 73, 355–362. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967171>.

- Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69, 167–174. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00247-2).
- Sawamura, M., Sun, S.H., Ozaki, K., Ishikawa, J., Ukeda, H., 1999. Inhibitory effects of citrus essential oils and their components on the formation of N-nitrosodimethylamine. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4868–4872. <https://doi.org/10.1021/jf9903206>.
- Seifi Nahavandi, B., Yaghmaei, P., Ahmadian, S., Ebrahim-Habibi, A., Ghobeh, M., 2020. Effects of terpinolene and physical activity on memory and learning in a model of Alzheimer's disease among rats. *Qom Univ. Med. Sci. J.* 14, 25–33. <https://doi.org/10.52547/QUMS.14.10.25>.
- Shin, S., 2004. In vitro inhibitory activities of essential oils from *Oenanthe javanica* DC against *Candida* and *Streptococcus* species. *Nat. Prod. Sci.* 10, 325–329.
- Soria-Gómez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., Ruchle, S., Remmers, F., Desprez, T., Matias, I., Wiesner, T., Cammich, A., Nissant, A., Wadleigh, A., Pape, H.C., Chiarlone, A.P., Quarta, C., Verrier, D., Vincent, P., Massa, F., Lutz, B., Guzmán, M., Gurden, H., Ferreira, G., Lledo, P.M., Grandes, P., Marsicano, G., 2014. The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat. Neurosci.* 17, 407–415. <https://doi.org/10.1038/nn.3647>.
- Sowndhararajan, K., Cho, H., Yu, B., Kim, S., 2015. Effect of olfactory stimulation of isomeric aroma compounds, (+)-limonene and terpinolene on human electroencephalographic activity. *Eur. J. Integr. Med.* 7, 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.enjim.2015.08.006>.
- Tang, Y., Zhu, W., Chen, K., Jiang, H., 2006. New technologies in computer-aided drug design: toward target identification and new chemical entity discovery. *Drug Discov. Today Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2006.09.004>.
- Terpinolene Terpinolene | C10H16 - PubChem [WWW Document], 2021. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terpinolene#section=3D-Conformer&fullscreen=true> (accessed 2.1.21).
- Tisserand, R., Young, R., 2014. *Essential Oil Safety, Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals: Second Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-52351-3>.
- Turkez, H., Aydin, E., Geyikoglu, F., Cetin, D., 2015. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene *in vitro*. *Cytotechnology* 67, 409–418. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9698-z>.
- Valli, M., Bolzani, V.S., 2019. Natural products: perspectives and challenges for use of Brazilian plant species in the bioeconomy. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91 <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190208>.
- Wang, J.L., Li, Y., Lei, C.L., 2009. Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Nat. Prod. Res.* 23, 1080–1088. <https://doi.org/10.1080/14786410802267759>.
- Yoshida, N., Koizumi, M., Adachi, I., Kawakami, J., 2006. Inhibition of P glycoprotein-mediated transport by terpenoids contained in herbal medicines and natural products. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2033–2039. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.003>.
- Yu, D., Wang, J., Shao, X., Xu, F., Wang, H., 2015. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *m. cinerea*. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1253–1262. <https://doi.org/10.1111/jam.12939>.
- Zhang, Z., Xie, Y., Wang, Y., Lin, Z., Wang, L., Li, G., 2017. Toxicities of monoterpenes against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24708–24713. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0219-4>.
- Zhang, Z., Yang, T., Zhang, Y., Wang, L., Xie, Y., 2016. Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Ind. Crops Prod.* 81, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.076>.
- Zhao, P., Wang, Y., Huang, W., He, L., Lin, Z., Zhou, J., He, Q., 2020. Toxic effects of terpinolene on *microcystis aeruginosa*: physiological, metabolism, gene transcription, and growth effects. *Sci. Total Environ.* 719, 137376 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137376>.

4.2 ARTIGO NO FORMATO DA REVISTA PARA O QUAL SERÁ SUBMETIDO

O artigo 2 trata do manuscrito originado do trabalho desenvolvido durante a dissertação, obtidos através da investigação do efeito anti-inflamatório *in vivo* do terpinoleno.

Artigo 2 – Estudo do potencial anti-inflamatório do terpinoleno em modelo murino

Autores: Isis Oliveira Menezes, Lucas Yure Santos da Silva, Renata Torres Pessoa, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Francisco Assis Bezerra da Cunha, Jaime Ribeiro Filho; Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, Irwin Rose Alencar de Menezes

Jornal/Revista: Phytomedicine / <https://www.sciencedirect.com/journal/phytomedicine/>

QUALIS: A1

Situação: A ser submetido

Normas para autores: <https://www.elsevier.com/journals/phytomedicine/0944-7113/guide-for-authors>

Resumo:

Contexto: Terpinoleno (C₁₀H₁₆), monoterpene não oxigenado de possível ação em enzimas envolvidas nesse processo inflamatório e comprovada ação antioxidante. **Propósito:** Objetivou-se avaliar a atividade anti-inflamatória aguda do terpinoleno em modelos murinos. **Desenho do estudo:** Foram conduzidas experimentações *in vivo* com animais não humanos por meio de metodologias de avaliação da atividade anti-inflamatória difundidos na literatura científica. **Métodos:** Os experimentos agudos incluem: ensaio de formalina, edema de pata por carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico e prostaglandina, edema de orelha por óleo de cróton, e o crônico: granuloma induzido pela implantação de *pellets* de algodão (CEUA 00346/2019-2). **Resultados:** Na avaliação da ação anti-inflamatória tópica (edema de orelha), todas as concentrações testadas (5, 10 e 20 mg/mL) exerceram efeitos significantes (33,82, 29,63 e 33,30%, respectivamente). O terpinoleno demonstrou significativa ação anti-inflamatória, sendo a dose de 200 mg/kg a única que promoveu resultados significantes no teste de formalina, reduzindo os tempos de lambadura e mordedura nas fases 1 (73,55 %) e 2 (96,61 %). No edema pela carragenina, todas as doses reduziram significativamente o edema: 50 mg/kg (T₁: 47,74%, T₂: 54,67%, T₃: 48,63% e T₄: 62,99%), 100 mg/kg (T₁: 72,86%, T₂: 71,03%, T₃: 48,63% e T₄: 57,83%) e 200 mg/kg (T₁: 43,22%, T₂: 34,11%, T₃: 36,47% e T₄: 45,20%), entretanto, no edema por dextrana, apenas a maior dose (200 mg/kg) foi significativa (T₁: 51,18%, T₂: 60%, T₃: 50,92% e T₄: 65,15%). Para avaliação da via envolvida, foi realizado o edema de pata induzido por histamina e ácido araquidônico com a maior dose. Os

resultados demonstraram redução significativa discreta e tardia (apenas no último tempo, com 63,92%) na presença de histamina, entanto, no edema envolvendo ácido araquidônico, o terpinoleno promoveu inibição em todos os tempos (T₁: 37,04%, T₂: 24,32%, T₃: 35,13% e T₄: 35,53%), confirmada pela redução significativa do edema de pata induzido por prostaglandina E₂. Para avaliação do potencial de atividade anti-inflamatória crônica (granuloma induzido por *pellets* de algodão) foi observado que o terpinoleno (200 mg/kg) foi capaz de reduzir do peso dos *pellets* (21,43%) e o teor de proteínas totais (36,21%). **Conclusão:** Conclui-se que o terpinoleno apresenta atividade anti-inflamatória aguda e crônica frente aos modelos experimentais testados contribuindo no desenvolvimento de novos produtos.

Estudo do potencial anti-inflamatório do terpinoleno em modelo murino

Isis Oliveira Menezes^a, Lucas Yure Santos da Silva^a, Renata Torres Pessoa^a, Andreza Guedes Barbosa Ramos^a, Francisco Assis Bezerra da Cunha^b, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a, Irwin Rose Alencar de Menezes^{a,*}

^a Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM); Departamento de Química Biológica; Universidade Regional do Cariri; Rua Coronel Antônio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil; isiso.menezes@outlook.com (I.O.M.); lucas.yure@urca.br (L.Y.S. da S.); trabalho.renata18@gmail.com (R.T.P.); andrezaurca@gmail.com (A.G.B.R.); anitaoliveira24@yahoo.com.br (A.O.B.P.B.M.); irwin.alencar@urca.br (I.R.A. de M.);

^b Laboratório de Bioprospecção do Semi-árido (LABSEMA), Departamento de Química Biológica; Universidade Regional do Cariri; Rua Coronel Antônio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil; cunha.urca@gmail.com (F.A.B. da C.).

*Autor correspondente

Irwin Rose Alencar de Menezes, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM); Departamento de Química Biológica; Universidade Regional do Cariri; Rua Coronel Antônio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil; Telefone: +55 88 98829-7247; Endereço de e-mail: irwin.alencar@urca.br

Resumo

Contexto: Terpinoleno (C₁₀H₁₆), monoterpene não oxigenado de possível ação em enzimas envolvidas nesse processo inflamatório e comprovada ação antioxidante.

Propósito: Objetivou-se avaliar a atividade anti-inflamatória aguda do terpinoleno em modelos murinos.

Desenho do estudo: Foram conduzidas experimentações *in vivo* com animais não humanos por meio de metodologias de avaliação da atividade anti-inflamatória difundidos na literatura científica.

Métodos: Os experimentos agudos incluem: ensaio de formalina, edema de pata por carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico e prostaglandina, edema de orelha por óleo de cróton, e o crônico: granuloma induzido pela implantação de *pellets* de algodão (CEUA 00346/2019-2).

Resultados: Na avaliação da ação anti-inflamatória tópica (edema de orelha), todas as concentrações testadas (5, 10 e 20 mg/mL) exerceram efeitos significantes (33,82, 29,63 e 33,30%, respectivamente). O terpinoleno demonstrou significativa ação anti-inflamatória, sendo a dose de 200 mg/kg a única que promoveu resultados significantes no teste de formalina, reduzindo os tempos de lambadura e mordedura nas fases 1 (73,55 %) e 2 (96,61 %). No edema pela carragenina, todas as doses reduziram significativamente o edema em: 50 mg/kg (T₁: 47,74%, T₂: 54,67%, T₃: 48,63% e T₄: 62,99%), 100 mg/kg (T₁: 72,86%, T₂: 71,03%, T₃: 48,63% e T₄: 57,83%) e 200 mg/kg (T₁: 43,22%, T₂: 34,11%, T₃: 36,47% e T₄: 45,20%), entretanto, no edema por dextrana, apenas a maior dose (200 mg/kg) foi significativa (T₁: 51,18%, T₂: 60%, T₃: 50,92% e T₄: 65,15%). Para avaliação da via envolvida, foi realizado o edema de pata induzido por histamina e ácido araquidônico com a maior dose. Os resultados demonstraram redução significativa discreta e tardia (apenas no último tempo, com 63,92%) na presença de histamina, entanto, no edema envolvendo ácido araquidônico, o terpinoleno promoveu inibição em todos os tempos (T₁: 37,04%, T₂: 24,32%, T₃: 35,13% e T₄: 35,53%), confirmada pela redução significativa do edema de pata induzido por prostaglandina E₂. Para avaliação do potencial de atividade anti-inflamatória crônica (granuloma induzido por *pellets* de algodão) foi observado que o terpinoleno (200 mg/kg) foi capaz de reduzir do peso dos *pellets* (21,43%) e o teor de proteínas totais (36,21%).

Conclusão: Conclui-se que o terpinoleno apresenta atividade anti-inflamatória aguda e crônica frente aos modelos experimentais testados contribuindo no desenvolvimento de novos produtos.

Palavras-chave: terpinoleno, antiedematogênica, inflamação tópica; inflamação crônica.

Lista de abreviaturas:

CGRP: Calcitonin Gene Related Peptide
COX: Enzima Cicloxigenase
EROs: Espécies reativas de oxigênio (Inglês: Reactive oxygen species)
IL: Interleucina
iNOs: Óxido nítrico sintase induzível
IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada
LOX: Enzima Lipoxigenase
LPS: Lipopolissacarídeo
NF-κB: Fator Nuclear *kappa* B
ON: Óxido nítrico
PGE₂: Prostaglandina E₂
PGs: Prostaglandinas
PLA₂: Fosfolipase A₂
TNF- α: Fator de Necrose tumoral

1. Introdução

O terpinoleno (1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene | C₁₀H₁₆) (PUBCHEM, 2021) é um monoterpene monocíclico de alta lipofilicidade (FALK *et al.*, 1990), amplamente encontrado na composição de plantas aromáticas como algumas espécies de pinheiros (GAD; AL-SAYED; AYOUB, 2021), entre outras espécies vegetais. A eficácia dos terpenos para o tratamento de câncer, dor neuropática e doenças de origem inflamatória já foram demonstradas utilizando modelos animais (KIM, Taejoon *et al.*, 2020). Com baixa toxicidade *in vivo* e *in vitro*, essa classe apresenta substâncias promissoras para a farmacoterapia. Estudos executados com o terpinoleno (de origem sintética ou por purificação) demonstram que este composto possui uma potente ação antiproliferativa para células tumorais por diminuição da expressão à proteína quinase 1, ação antioxidante, antifúngica, inseticida, e larvicida e anti-inflamatória, entre outras (MENEZES *et al.*, 2021).

Mesmo com a atividade da classe dos monoterpenos bem delimitada (SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013), dados experimentais publicados na literatura que atestem as atividades do terpinoleno puro, são escassas, havendo apenas dois estudos associados diretamente a atividade anti-inflamatória (DE CHRISTO SCHERER *et al.*, 2019; MACEDO *et al.*, 2016). Entretanto, alguns possíveis alvos foram identificados e indicaram que há possível interação com alvos farmacológicos inflamatórios como receptores serotoninérgicos e correlação com a via dos eicosanóides (MENEZES *et al.*, 2021). A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo a agressores endógenos ou exógenos caracterizada por quatro sinais cardinais: dor, rubor, calor, edema e, em alguns casos, acabam culminando com perda total ou parcial da função fisiológica (VIVIER; MALISSEN, 2005). O estímulo nocivo promove acionamento de mecanismos imunes que produzem respostas sanguíneas e celulares que visam o restabelecimento do estado homeostático, regeneração e manutenção da integridade tecidual (BOLZANI, 2016).

Considerando a importância da terapêutica na modulação de processos inflamatórios, a relação promissora desse terpeno com alvos farmacológicos e a subavaliação de estudos envolvendo o terpinoleno nessa temática, esta pesquisa objetivou avaliar o potencial anti-inflamatório agudo (efeito antiedematogênico) e crônico do terpinoleno em modelo murino.

2. Materiais e métodos

2.1. Aspectos éticos da pesquisa

A pesquisa foi rigorosamente em conformidade e conduzida em estrita obediência às normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo animais (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 2011; Lei Federal Nº 11.794, 2008); e integridade da fauna e flora (BRASIL, 1998) (DALBEN; EMMEL, 2013), sendo a mesma aprovada no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob numeração 00346/2019-2.

2.2 Delineamento do estudo

Estudo de caráter experimental randomizado com animais não-humanos, de natureza quantitativa. O instrumento de coleta de dados foi executado através dos modelos farmacológicos *in vivo* para observação dos efeitos das drogas testadas. O método experimental consistiu essencialmente em submeter os objetos de estudo à influência de variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que a variável evidenciou no objeto (GIL, 2008).

2.3 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), albinos, cepa *Swiss* de ambos os sexos, com massa corpórea delimitada entre 20-30 g, escolhidos randomicamente. Estes foram mantidos acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura entre $22 \pm 3^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®).

2.4 Drogas

Substâncias utilizadas: terpinoleno, carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico, prostaglandina E₂ e óleo de cróton (Sigma-Aldrich), kit para dosagem de proteínas (Labtest), decadron (Aché), quetamina (VETNIL), e xilazina (anasedan - CEVA Brasil).

A DL₅₀ do terpinoleno em ratos por administração oral foi de 4390 mg/kg de terpinoleno (OPDYKE, 1976), portanto, optou-se por utilizar valores inferiores a 10% do valor da DL₅₀, escolhendo as doses 50, 100 e 200 mg/kg (diluídas em água para injeção com Tween 80). As doses utilizadas das demais substâncias são discriminadas nas respectivas metodologias experimentais.

2.5 Teste de formalina

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6/grupo) para serem tratados por via oral com água para injeção (controle negativo) ou terpinoleno (diluído com tween) nas doses de 50 ou 100 ou 200 mg/kg. Após 1 hora os animais foram submetidos a uma injeção de 20 µL de formalina 2,5 % na pata direita (espaço sub-plantar), e colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho, com a finalidade de facilitar a observação. O tempo transcorrido (em segundos) que o animal lambeu e/ou mordeu a pata durante as 2 fases: 1ª ou inicial (0-5 min) e 2ª ou tardia (15-30 min) foi registrado por pesquisadores que não estavam responsáveis pela administração medicamentosa ou do agente flogístico (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992).

2.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos agudos: edema de orelha induzido por óleo de cróton, edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico e prostaglandina E₂ e como modelo crônico: granuloma induzido por *pellets* de algodão.

2.6.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6/grupo) para pré-tratamento das orelhas direitas topicamente com água injetável (controle negativo), ou concentrações 5 ou 10 ou 20 mg/mL de terpinoleno

(aplicações de 20 µL, sendo: 10 µL face externa e 10 µL face interna das orelhas), esperando 15 minutos para absorção. Após 1 hora, foi aplicado 20 µL do agente flogístico óleo de cróton a 5 % (v/v) diluído em acetona nas orelhas direitas e 20 µL do veículo nas orelhas esquerdas. Decorridas 6 horas, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical para posterior retirada das orelhas, cortadas em discos de 6 mm de diâmetro com *punch* (perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (TUBARO *et al.*, 1986).

2.6.1.1 Quantificação do edema e do efeito inibitório médio.

Os discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas direitas (tratamento com o agente flogístico) e das esquerdas (tratadas com o veículo), foram pesados e utilizados na quantificação do percentual de inflamação em cada animal analisado. O edema de orelha, evidenciado em percentual de acréscimo na massa, em gramas, da orelha, mensurado em balança analítica cujos valores compõe o cálculo da porcentagem de edema, que consiste da diferença da massa do disco da orelha e esquerda, dividido pela massa do disco esquerdo, multiplicado por 100. O efeito inibitório médio da inflamação (EIM, em %) de cada tratamento, foi calculado pela fórmula: a diferença entre a média do percentual de edema do grupo controle e do tratado sujeitado ao tratamento com água para injeção, dividido pela média do controle, multiplicado por 100.

2.6.2 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de agente flogístico: carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico (AA), prostaglandina E₂ (PGE₂)

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6/grupo), os quais tiveram o volume inicial (Vi) da pata posterior direita e esquerda avaliados por pletismometria (medida basal). Logo em seguida, os animais foram pré-tratados por via oral com água para injeção (controle negativo) ou terpinoleno nas doses 50 ou 100 ou 200 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, os animais receberam (20 µL) na pata posterior direita e veículo (20 µL) na pata esquerda. O volume das patas traseiras foi registrado por pletismometria após injeção do agente flogístico em tempos específicos de acordo com a metodologia correspondente de cada substância sendo: carragenina e dextrana volume registrado após 1, 2, 3 e 4 horas (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962), histamina após 30, 60, 90, 120 e 180 min (MALING *et al.*, 1974), ácido araquidônico após 15, 30, 45, 60 e 90 min (DIMARTINO *et al.*, 1987), e prostaglandina E₂ após 15, 30, 45 e 60 min (CAMPOS; CALIXTO, 1995).

2.6.2.1 Mensuração de edema de pata

A expressão dos resultados foram obtidos pelas diferenças entre o volume final e o volume inicial (antes da injeção do agente flogístico) da pata direita e esquerda de cada tempo, calculados na fórmula: $Ve = Vf - Vi$, sendo: Ve = volume do edema (em ml), Vf = volume final e Vi = volume inicial (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

2.6.3 Granuloma induzido pela implantação de pellets de algodão

Os animais foram previamente anestesiados com 80 mg/kg de quetamina e 20 mg/kg de xilazina (anasedan) para serem submetidos a cirurgia através de uma pequena incisão dorsal para implantação de quatro *pellets* de algodão (posicionados tanto no lado direito como esquerdo dos quadrantes superior e inferior do dorso dos animais). Após a sutura, os animais foram divididos em três grupos; (1) 10 mg/kg de água para injeção (controle negativo), (2) 5mg/kg de dexametasona (controle positivo) e (3) terpinoleno 200 mg/kg por via oral, durante dez dias consecutivos a partir do dia da implantação dos *pellets*. No décimo primeiro dia, foram submetidos a eutanásia, e os blocos de algodão, com o tecido fibrovascular circundante, foram removidos, e postos durante 12 horas em liofilizador para a secagem dos *pellets* e, em seguida, determinado o peso dos *pellets*. Os resultados foram expressos como a diferença entre o peso seco inicial (40mg, 10mg cada bloco de algodão) e final. Após as medidas do peso seco dos *pellets*, eles foram colocados em tubos de ensaios, separados por grupos e animais, foi feito homogenato com 1 mL de salina 0,9% para posterior dosagem de proteínas totais por espectrofotometria (LALITHA; SETHURAMAN, 2010).

2.7 Análise estatística

Os resultados das análises efetuadas foram desenvolvidas tomando como base à média e seu correspondente erro padrão da media (E.P.M.). A análise estatística utilizada foi ANOVA, utilizando o software *Prism for Windows (GraphPad Software)*. Foram consideradas diferenças significativas de valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Screening para avaliação do potencial anti-inflamatório tópico e sistêmico

Para triagem da avaliação do potencial anti-inflamatório do terpinoleno aplicado topicamente foi usado o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, e aplicado de forma oral foram selecionados o teste de formalina e edema de pata induzido por carragenina.

A aplicação tópica do terpinoleno (5, 10 e 20 mg/mL) na orelha dos animais promoveu redução significativa de 33,82, 29,63 e 33,30% respectivamente, do edema induzido pelo óleo de cróton quando comparado ao grupo controle (Figura 1). Entretanto, não ocorreu diferença significativa entre as concentrações.

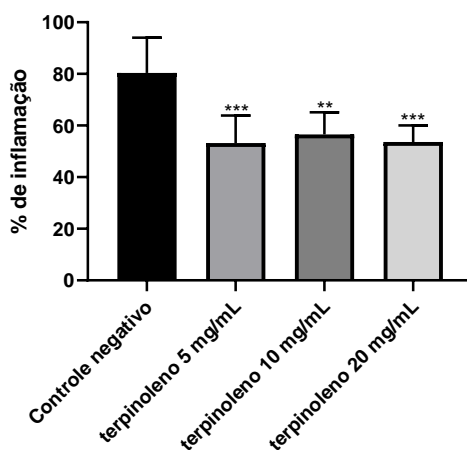


Figura 1: Efeito do terpinoleno (aplicação tópica) sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Efeito do terpinoleno sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (**= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$ vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de *Dunnnett* com múltiplas comparações.

No teste de formalina associada à lesão tecidual, a reação da primeira fase é decorrente da ativação aguda dos nociceptores periféricos gerando percepção de dor, enquanto, que na segunda a reação é resultante da resposta inflamatória aguda. Portanto, esse teste é essencial para avaliação simultânea do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório. Para o teste de formalina, foi realizada a administração oral do terpinoleno nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, entretanto, apenas a maior dose (200 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de lambertura e mordedura na pata em 73,55 % e 96,61 %, nas fases 1 (dor neurogênica: de 0 a 5 minutos) e 2 (dor inflamatória: de 15 a 30 minutos), respectivamente (figura 2). Nesse ensaio, observou-se diminuições nos tempos de lambertura e mordedura significativas em ambas as fases, ou seja, o aprofundamento de estudo do terpinoleno em ambos os perfis (avaliação do potencial frente a estímulos nociceptivos/algésicos, ou inflamatórios) são pertinentes, entretanto, optamos pela vertente anti-inflamatória, que demonstrou porcentagem de inibição um pouco superior que a fase 1.

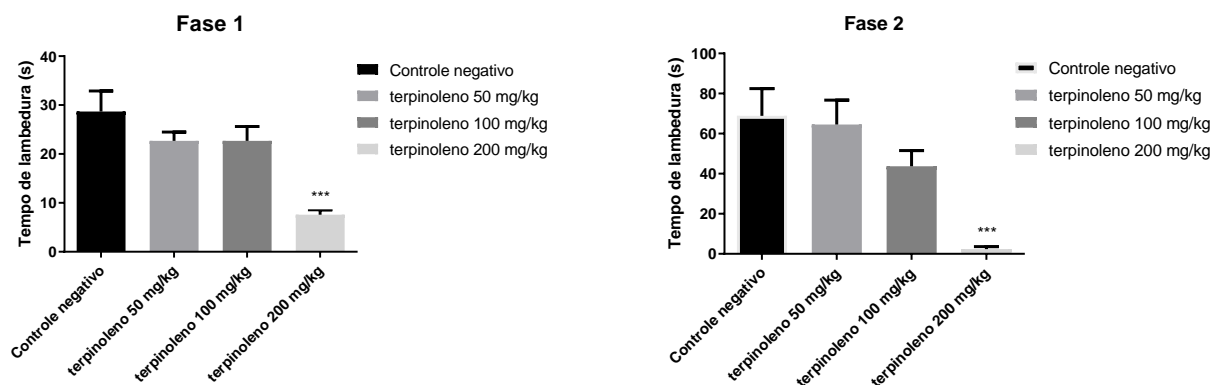


Figura 2: Efeito do terpinoleno sobre o tempo de lambedura da pata traseira direita na primeira e segunda fase do teste de formalina. Efeito do terpinoleno sobre o tempo de lambedura e mordedura da pata no teste de formalina na primeira fase e segunda fase (**= $p < 0,001$ vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de *Tukey* com múltiplas comparações.

O modelo de edema por carragenina é um dos métodos mais populares para avaliação de drogas e terapias anti-inflamatórias por apresentar mediadores predominantes na fase inicial e outros em fase tardia. A utilização desses métodos pode não somente avaliar o potencial de ação anti-inflamatórias, como indicar possibilidade das vias envolvidas, além de confirmar o potencial nociceptivo. Na avaliação da atividade anti-inflamatória (antiedematogênica) através do modelo de edema de pata induzido pela carragenina, o terpinoleno mostrou uma redução significativa do edema correlacionado ao tempo transcorrido nas doses de 50 mg/kg (T₁: 47,74%, T₂: 54,67%, T₃: 48,63% e T₄: 62,99%), 100 mg/kg (T₁: 72,86%, T₂: 71,03%, T₃: 48,63% e T₄: 57,83%) e 200 mg/kg (T₁: 43,22%, T₂: 34,11%, T₃: 36,47% e T₄: 45,20%) em comparação ao grupo controle (veículo) (Figura 3). Na figura, também se observa redução significativa das doses 50, 100 e 200 mg/kg a partir da análise da área/curva (AUC) sendo de 53,51%, 62,42% e 40,02%, respectivamente.

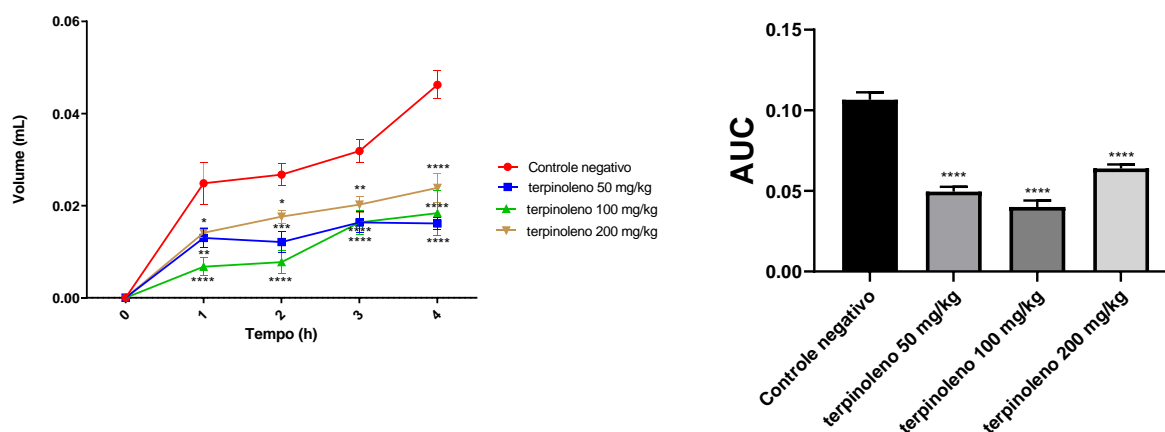


Figura 3: Efeito do terpinoleno (v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina. Efeito do terpinoleno sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina a 1% até a 4ª hora; Percentual de edema com relação à área/curva (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$ vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de *Bonferroni*. *T test* não pareado.

3.2 Avaliação da via da histamina no potencial anti-inflamatório pelo edema de pata induzido por dextrana e histamina

Para avaliação da influência do terpinoleno sobre a liberação da histamina foi determinada pelo edema de pata por dextrana, um polissacarídeo reconhecido pela capacidade de liberar dos mastócitos os mediadores histamina e serotonina, seguida pelo edema induzido pela histamina. No modelo de edema de pata induzido por dextrana, apenas a dose de 200 mg/kg demonstrou uma redução significativa do edema (T₁: 51,18%, T₂:

60%, T₃: 50,92% e T₄: 65,15%) em comparação ao grupo controle (veículo) (Figura 4). Na figura 4, observa-se uma redução significativa das doses para as doses 50, 100 e 200 mg/kg testadas de terpinoleno a partir da análise da área/curva (AUC) sendo 24,30%, 16,45% e 47,92%, respectivamente.

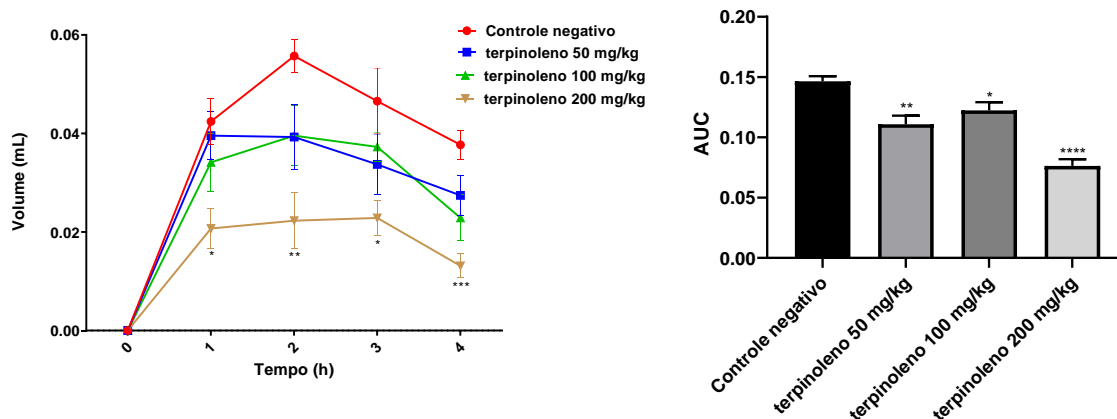


Figura 4: Efeito do terpinoleno (v.o.) sobre o edema de pata induzido por dextrana. Efeito do terpinoleno sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de dextrana a 1% até a 4ª hora e com relação a área/curva (*= p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001 vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de Tukey com múltiplas comparações. ANOVA seguida do Teste de Dunnett com múltiplas comparações.

No edema de pata induzido por histamina, apesar do terpinoleno na dose de 200 mg/kg ter demonstrado ação efetiva em todos os tempos de análise no modelo de dextrana, mostrou uma redução significativa somente após 3h de análise no modelo de histamina quando comparados ao grupo controle negativo (veículo) (Figura 5). Nesse modelo, há a injeção direta da histamina, ou seja, o perfil de produção e liberação desse mediador não é discutido, apenas sua ação (interação histamina-sítios ativos). Como observado, o terpinoleno interfere no edema de forma discreta (Figura 5 – AUC: 10 %) e tardia (inibição significativa apenas no último tempo, com 63,92%), diferentemente com o dado obtido no edema induzido por dextrana, sendo a interferência da sinalização mediada por histamina um alvo improvável do terpinoleno.

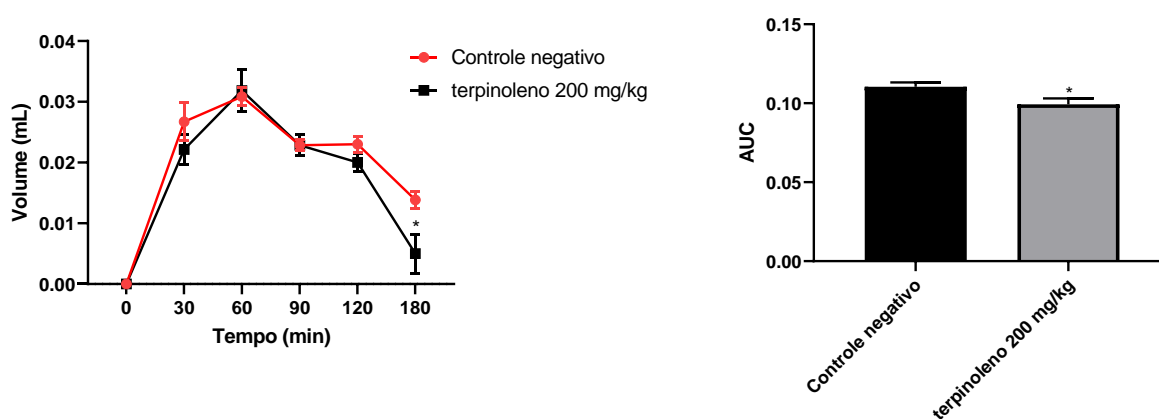


Figura 5: Efeito do terpinoleno (v.o.) sobre o edema de pata induzido por histamina. Efeito do terpinoleno sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de histamina a 1% até 180 minutos e com relação a área/curva. ANOVA seguida do Teste de Bonferroni com múltiplas comparações.

3.3 Avaliação da via dos eicosanoides no potencial anti-inflamatório pelo edema de pata por ácido araquidônico e prostaglandina E₂

No edema de pata induzido por ácido araquidônico, o terpinoleno na dose de 200 mg/kg mostrou uma redução significativa de 37,04%, 24,32%, 35,13% e 35,53% nos tempos 30, 45, 60 e 90 min, respectivamente, comparados ao grupo controle (Figura 6).

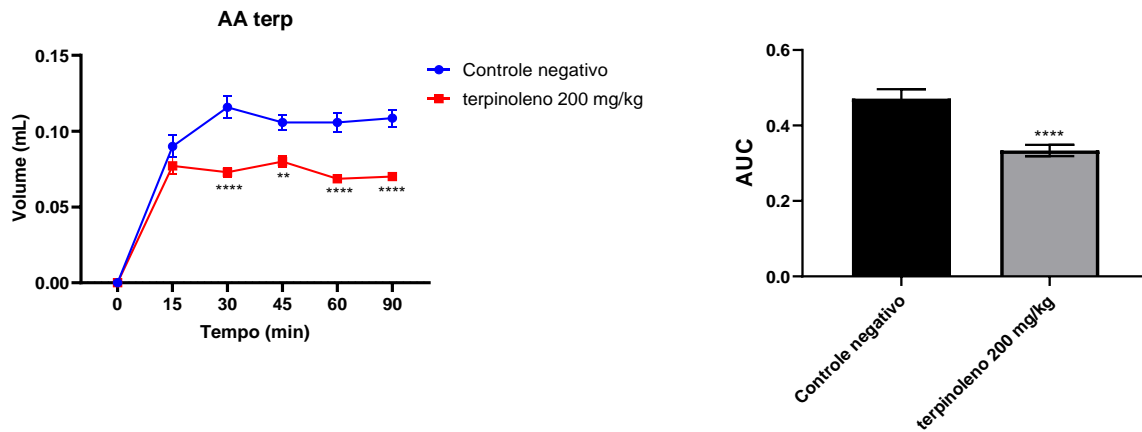


Figura 6: Efeito do terpinoleno (v.o.) sobre o edema de pata induzido por ácido araquidônico. Efeito do terpinoleno sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de ácido araquidônico a 1% até 90 minutos e com relação a área/curva (**= $p < 0,01$; ****= $p < 0,0001$ vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. *T test* não pareado.

No edema de pata induzido por prostaglandina E₂, o terpinoleno na dose de 200 mg/kg mostrou uma redução significativa apenas no 30º minuto, de 41,36% quando comparado ao grupo controle (Figura 7).

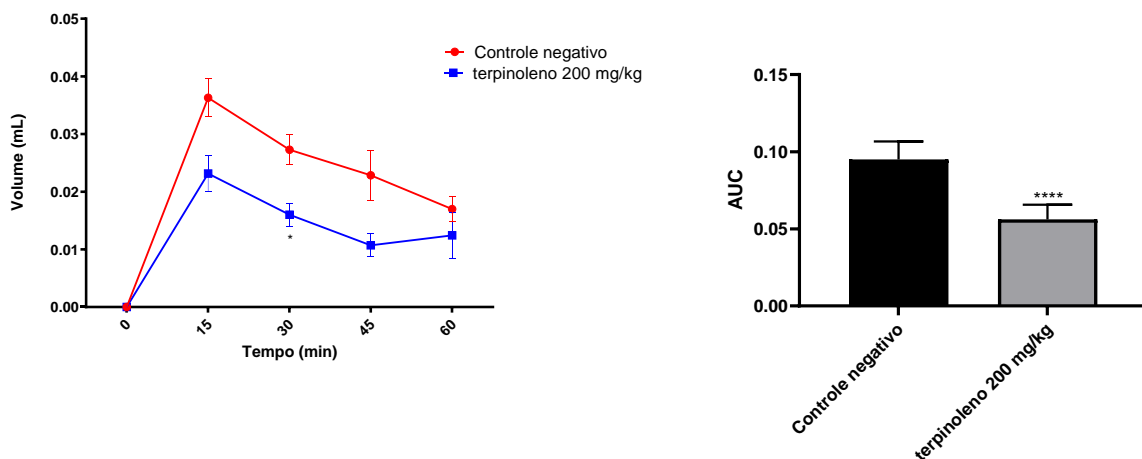


Figura 7: Efeito do terpinoleno (v.o.) sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E₂. Efeito do terpinoleno sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de prostaglandina E₂ até 60 minutos e com relação a área/curva (*= $p < 0,05$; ****= $p < 0,0001$ vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de *Sidak* com múltiplas comparações. *T test* não pareado.

Por meio desses ensaios, identificamos uma clara interação com relação a via dos eicosanoides, em que o terpinoleno promoveu reduções dos edemas promovidos por AA e PGE₂, destacando-se o efeito geral

da PGE₂ (AUC com inibição do edema em 40,94%) (figura 7) superior ao observado no edema mediado por AA (AUC inibindo 29,23%) (figura 6), com possível ação mais efetiva no receptor ou mecanismos gerais vasculares ligados à PGE₂.

3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória crônica por Granuloma induzido por pellets de algodão

No teste de granuloma induzido por *pellets* de algodão, a dexametasona (controle positivo) e terpinoleno 200 mg/kg foram capazes de reduzir de forma significativa. Nele, o terpinoleno reduziu 21,43 % do peso dos *pellets* e 36,21 % da concentração de proteínas totais no homogenato quando comparado ao grupo controle negativo (veículo) (figura 8).

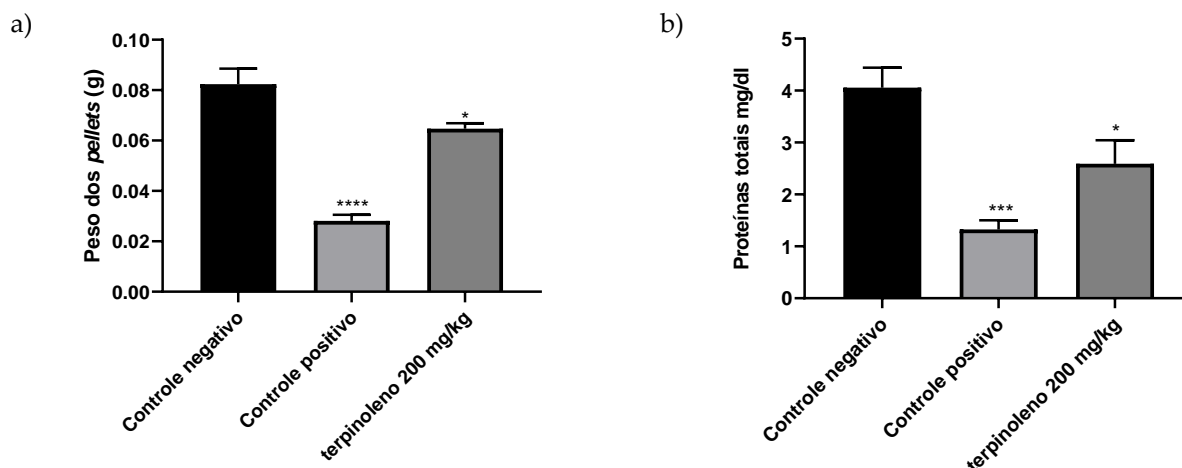


Figura 8: Ação do terpinoleno sobre o efeito do granuloma por implantação de blocos de algodão. (a) peso de *pellets* (g) e (b) teor de proteínas totais (mg/dl). Resultado do peso final dos *pellets* de algodão menos o peso inicial. Dosagem proteínas totais do homogenato dos *pellets* de algodão (**= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$ vs. controle negativo). ANOVA seguida do Teste de *Dunnett* com múltiplas comparações. ANOVA seguida do Teste de *Tukey* com múltiplas comparações.

4. Discussão

A inflamação é um fator importante no estabelecimento da homeostase humana. Quando apresenta ação exacerbada ou crônica, ocasiona intensificação da dor e perda de função causando problemas ao organismo (VIVIER; MALISSEN, 2005). Para minimizar esses efeitos são utilizadas substâncias com capacidade anti-inflamatória que possam intervir nesse processo sem impactar na capacidade de regeneração e estabilidade dinâmica do organismo (SILVA *et al.*, 2019; VIVIER; MALISSEN, 2005). Embora outros monoterpeno tenham o perfil anti-inflamatório mais estudado (SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013), o terpinoleno, composto elencado, é de escassa avaliação de sua atuação biológica como observado em estudo anterior (MENEZES *et al.*, 2021), no qual há, embora já tenha um destaque em algumas atividades a ação sobre mecanismos inflamatórios ainda são pouco encontradas, onde há necessidade de explorar mais profundamente o seu mecanismo de ação e potenciais usos. De forma computacional, há possíveis alvos correlacionados com essa ação, e avaliamos *in vivo* a possível efetividade deste monoterpeno.

Como uma forma de análise simultânea do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, o teste de formalina foi executado, por consistir em um experimento com estímulo nociceptivo químico composto por duas fases que permitem: identificar tanto o potencial analgésico (nocicepção neurogênica) pela fase I (0-5 minutos) motivada por estimulação direta dos nociceptores e atividade anti-inflamatória (dor induzida por inflamação) e pela fase II (15-30 minutos) com liberação dos mediadores pró-inflamatórios: serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas (PGs) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A lesão tecidual causada pela formalina provoca a liberação de neuropeptídeos como taquicinininas das terminações nervosas periféricas. Estes neuropeptídeos como substância P, neurocinina A – NKA estão relacionados com o extravasamento de proteínas ocorre nas vênulas pós-capilares, dilatação das arteríolas relacionada com peptídeos relacionados

ao gene da calcitonina (CGRP) (MARCHAND, 2017). Enquanto mediadores secundários como histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores de mastócitos também são eficazes na fase tardia.

Dados da literatura demonstram evidências que terpenos apresentam capacidade intervir em canais TRPA1, incluindo TRPV1 e TRPV4, reduzindo sinalização de dor e liberação neuropeptídios substância P e CGRP (ABBAS, 2020; JANSEN *et al.*, 2019). A avaliação dos resultados das fases 1 e 2 mostraram que o terpinoleno apresentou inibição significativa em ambas as fases. Considerando apenas os dados obtidos no teste de formalina, o prosseguimento de ambos os ensaios (nociceptivos quanto inflamatórios) seriam pertinentes, uma vez que ambos foram significativos na redução do tempo de lambadura e mordedura (na mesma dose), dessa forma optou-se pelo prosseguimento pela fase de inibição mais expressiva, a fase 2 (vertente inflamatória) que está relacionada especialmente com mediadores secundários como histamina, serotonina e prostaglandinas. O potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do terpinoleno também foi executado *in vivo* por Macedo e colaboradores (2016), no qual os pesquisadores mostraram que o efeito anti-inflamatório e analgésico é decorrente do envolvimento dos receptores de serotonina 5-HT_{2A} (MACEDO *et al.*, 2016), no qual pode estar relacionado com a complexa modulação da serotonina sobre a resposta do sistema imune e citocinas como observa-se na redução de TNF e aumento de IL-1 β (CLOË Z-TAYARANI; CHANGEUX, 2007).

Em relação ao processo inflamatório, o edema de orelha induzido por óleo de cróton é uma modelo de triagem para substâncias atuantes na fase aguda da inflamação, nele, o composto terpinoleno, em todas as concentrações, foi capaz de inibir o edema de orelha promovido por óleo de cróton, que é um modelo de inflamação decorrente da ação do TPA (ácido 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol), presente no óleo de cróton, que provoca uma dermatite mediada por liberação de amins vasoativas e derivados do ácido araquidônico (TUBARO *et al.*, 1986). Nesse modelo, o efeito observado pode ser, em parte, explicado por sua lipossolubilidade que resulta no aumento da biodisponibilidade local do terpinoleno devido sua absorção transdérmica.

Incluída nos agentes flogísticos utilizados para induzir o edema, a carragenina é um glicosaminoglicano responsável por promover aumento no volume da pata (edema) por rápida e elevada produção de mediadores químicos, extravasamento vascular e vasodilatação (CECÍLIA; MURGAS, 2014). Caracterizado em duas fases, cuja fase inicial (60-90 minutos) está associada à liberação de histamina, serotonina e bradicinina e a fase tardia (entre 4 e 6 horas) com elevada produção de prostaglandinas (PGs) (LAM; FERRELL, 1989; PATIL *et al.*, 2019). Já a dextrana, promove exacerbação da permeabilidade vascular e ativação de amins vasoativas (histamina e serotonina) (LAM; FERRELL, 1989; PATIL *et al.*, 2019; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). Estudos com limoneno demonstram a atividade antiedematogênica pelo modelo de edema de pata por carragenina (YILMAZ; ÖZBEK, 2018), também demonstrado pelo nootkatone nos edemas de pata por carragenina e dextrana (DANTAS *et al.*, 2020).

Para os demais ensaios (induzido por histamina, ácido araquidônico, prostaglandina E₂ e implantação de *pellets*) foi utilizada a dose de 200 mg/kg, uma vez que esta foi a única que apresentou inibição significativa nos testes de formalina, carragenina e edema de pata por dextrana. No edema induzido por histamina, percebeu-se apenas um efeito tardio e discreto, o que sugere uma atuação contida da histamina nos receptores H₁ e H₂. Receptores H₁ estão envolvidos na contração das células do músculo liso vascular e das vias aéreas, aumento da permeabilidade das células endoteliais vasculares, síntese de prostaciclina. De acordo com O'Mahony; Akdis e Akdis (2011) os receptores H₂R podem modular uma gama de atividades do sistema imunológico, como desgranulação de mastócitos, síntese de anticorpos, produção de citocinas TH₁ e proliferação de células T, fator de ativação de plaquetas e na modulação da secreção de citocinas dos basófilos, entretanto, o bloqueio desses receptores não abole completamente a resposta inflamatória. Diferentemente do terpinoleno, que foi significativo apenas no último tempo de avaliação, o 1,8-cineol teve atividade anti-inflamatória na fase aguda e crônica demonstrando eficácia na redução do edema induzido por histamina, ácido araquidônico e granuloma (MARTINS *et al.*, 2017).

O agente flogístico ácido araquidônico (AA) está associado a diversos processos incluindo: ativação, proliferação, comunicação, metabolismo, migração e apoptose celular. Em processos fisiológicos, patológicos e inflamatórios é degradado pelas enzimas lipoxigenases (LOX) e cicloxigenases (COX), produzindo

leucotrienos e prostaglandinas, respectivamente. Ambas as vias também geram vários intermediários de radicais livres, juntamente com a produção de radicais hidroxila e superóxido (KUEHL; EGAN, 1980; YAQOUB, 2003). As prostaglandinas (PGs) são ácidos graxos oxigenados formadas a partir do metabolismo oxidativo do ácido araquidônico (KUEHL; EGAN, 1980) que levam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)/radicais livres, eicosanóides envolvidos no dano tecidual e morte celular em várias doenças inflamatórias (UMAMAHESWARAN *et al.*, 2018). O subtipo prostaglandinas E₂ tem elevado potencial hiperalgésico e promove edema na pata de camundongos especialmente pela estimulação de receptores EP₃ (CLAUDINO *et al.*, 2006).

Nossos achados sugerem que o terpinoleno age na PGE₂, possivelmente inibindo receptores EP₃ (não descartando a ação de receptores EP₁) ou alguma via de sinalização subjacente, como a permeabilidade vascular. A resposta antiedematogênica observada corroboram com dados da literatura que mostram propensão em interagir enzimas COX-1 e 5-LOX (MENEZES *et al.*, 2021). Estudos anti-inflamatórios com o limoneno destacam a atuação desse monoterpene não oxigenado na liberação de mediadores pró-inflamatórios: tem atuação supressora dose-dependente na produção de óxido nítrico (ON) e PGE₂ induzidas por LPS, e expressão de iONS e proteínas COX 2, citocinas TNF- α , IL-1 β , e IL-6 e espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos RAW 264,7 (YOON; LEE; HYUN, 2010).

A resposta inflamatória e imune é amplamente influenciada pelo sistema NF- κ B, regulador mestre da via de sinalização de respostas imunes que está ligada à rede de sinalização NF- κ B, seja diretamente ou via sinalização de citocinas. Os genes da resposta inflamatória são os genes-alvo mais comuns que participam da ativação da sinalização do NF- κ B, são essenciais para o desenvolvimento e função dos linfócitos T e B, sendo que a desregulação dessas células causa inúmeras doenças inflamatórias (KUNNUMAKKARA *et al.*, 2020). O equilíbrio dos níveis de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias são importantes na resposta inflamatória. Embora limitações laboratoriais tenham impedido a realização de dosagens de algumas citocinas envolvidas no processo inflamatório, é sabido que as prostaglandinas são mediadoras da inflamação aguda, mas também funcionam na transição e na manutenção da inflamação crônica mediante intensificação de liberação de citocinas, quimiocinas e aumentando o recrutamento de células inflamatórias (AOKI; NARUMIYA, 2012). Além desses fatores, a enzima como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), citocinas e quimiocinas também têm papéis importantes na inflamação crônica.

Na atividade inflamatória no modelo crônico de granuloma induzido por corpo estranho acredita-se que o terpinoleno na dose de 200 mg/kg tenha promovido a redução significativa do peso e concentração de proteínas totais dos *pellets* (corpo estranho) pela atenuação da fase proliferativa acompanhada da supressão de fatores pró-inflamatórios. Dados semelhantes foram encontrados em terpenos como 1,8-cineol demonstrando eficácia na redução do e granuloma (MARTINS *et al.*, 2017) e o nootkatone, que exerceu efeitos anti-inflamatórios agudos e crônicos associados à inibição da produção de IL1- β e TNF- α , possivelmente devido à inibição da atividade da COX-2 e antagonismo do receptor H₁, e redução do peso e concentração de proteínas totais também pelo modelo de granuloma (DANTAS *et al.*, 2020). O estudo de Christo Scherer e colaboradores (2019) mostrou que o terpinoleno, *in vitro*, suprimiu a produção de óxido nítrico produzidos por macrófagos humanos RAW 267,2 sem promover efeitos citotóxicos, bem como suprimiu a atividade da NF- κ B e as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α com resposta dose-dependente e aumentou a proliferação e migração de fibroblastos, na avaliação da capacidade cicatrizante observada no estudo. Monoterpenos como p-cymeno, myrceno, α -pineno (SALAKHUTDINOV; VOLCHO; YAROVAYA, 2017) e limoneno demonstra ação anti-inflamatória por reduzir a infiltração de leucócitos, nível da citocina pró-inflamatória TNF- α (KUMMER *et al.*, 2013), citocinas TNF- α , IL-1 β , e IL-6 e espécies reativas de oxigênio em macrófagos RAW 264,7 (YOON; LEE; HYUN, 2010).

A partir dos resultados obtidos e corroborados com a literatura, é possível observar a ação promissora do terpinoleno na atividade anti-inflamatória aguda, demonstrada pela atuação antiedematogênica, além de apresentar efeito em modelo crônico.

5 Conclusão

O terpinoleno apresentou atividade anti-inflamatória efetiva tópica e sistêmica em modelos agudos e crônicos. O efeito observado é dose dependente, sendo a maior dose (200 mg/kg), a única dose efetiva em todos os ensaios para a redução da atividade inflamatória aguda (antiedematogênica) e crônica. Acredita-se que esta ação é decorrente de sua atividade antioxidante, redução da proliferação e que esta é mediada pela via dos eicosanoides. Esses resultados fornecem suporte para a candidatura promissora do terpinoleno na atuação de ação aguda e crônica e seguimento de testes mais específicos a fim de assegurá-lo como alternativa no tratamento de processos inflamatórios.

Contribuições do Autor: Conceituação: Isis Oliveira Menezes, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins e Irwin Rose Alencar de Menezes; Investigação: Isis Oliveira Menezes, Lucas Yure Santos da Silva e Renata Torres Pessoa; Análise: Isis Oliveira Menezes e Irwin Rose Alencar de Menezes; Leitura, revisão e edição: Isis Oliveira Menezes, Lucas Yure Santos da Silva, Renata Torres Pessoa, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Francisco Assis Bezerra da Cunha, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, Irwin Rose Alencar de Menezes. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Este estudo foi financiado, em parte, pela Coordenação para a Melhoria do Pessoal do Ensino Superior - Brasil (CAPES), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiador de Estudos e Projetos - Brasil (FINEP).

Agradecimentos: Os autores reconhecem o apoio financeiro das agências brasileiras CNPq, CAPES e Funcap, bem como o apoio da Universidade Regional de Cariri (URCA).

Conflitos de Interesse: Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

Referências

- Abbas, Manal Ahmad. 2020. "Modulation of TRPV1 Channel Function by Natural Products in the Treatment of Pain." *Chemico-Biological Interactions* 330 (October): 109178. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109178>.
- Aoki, Tomohiro, and Shuh Narumiya. 2012. "Prostaglandins and Chronic Inflammation." *Trends in Pharmacological Sciences* 33 (6): 304–11. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.004>.
- Bolzani, Vanderlan da S. 2016. "Biodiversidade, Bioprospecção e Inovação No Brasil." *Ciência e Cultura* 68 (1): 4–5.
- BRASIL. 1998. *Lei Federal Nº 9605 Do Ano 1998*. Brasília, DF. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm.
- Campos, Maria M., and João B. Calixto. 1995. "Involvement of B1 and B2 Receptors in Bradykinin-Induced Rat Paw Oedema." *British Journal of Pharmacology* 114 (5): 1005–13. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13305.x>.
- Cecília, Flávia Viana Santa, and Luis David Solis Murgas. 2014. "Boletim Técnico Universidade Federal De Lavras Departamento De Medicina Veterinária Métodos De Avaliação Laboratorial Da Atividade Antinociceptiva E Anti-Inflama-Tória De Produtos Naturais," 1–35.
- Christo Scherer, Marcella Malavazi de, Franciane Martins Marques, Mariana Moreira Figueira, Maria Carolina Oliveira Peisino, Elisângela Flávia Pimentel Schmitt, Tamara P Kondratyuk, Denise Coutinho Endringer, Rodrigo Scherer, and Marcio Fronza. 2019. "Wound Healing Activity of Terpinolene and α -Phellandrene by Attenuating Inflammation and Oxidative Stress in Vitro." *Journal of Tissue Viability* 28

(2): 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.02.003>.

- Claudino, Rafaela F., Candida A.L. Kassuya, Juliano Ferreira, and João B. Calixto. 2006. "Pharmacological and Molecular Characterization of the Mechanisms Involved in Prostaglandin E2-Induced Mouse Paw Edema." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318 (2): 611–18. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.102806>.
- Cloë Z-Tayarani, Isabelle, and Jean-Pierre Changeux. 2007. "Nicotine and Serotonin in Immune Regulation and Inflammatory Processes: A Perspective." *Journal of Leukocyte Biology* 81 (3): 599–606. <https://doi.org/10.1189/JLB.0906544>.
- Dalben, Djeisa, and João Luís Emmel. 2013. "A Lei Arouca e Os Direitos Dos Animais Utilizados Em Experimentos Científicos." *Revista Eletrônica de Iniciação Científica* 4 (4): 280–91.
- Dantas, Lindaiane Bezerra Rodrigues, Ana Letícia Moreira Silva, Cícero Pedro Da Silva, Isabel Sousa Alcântara, Maria Rayane Correia De Oliveira, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, Jaime Ribeiro-Filho, et al. 2020. "Nootkatone Inhibits Acute and Chronic Inflammatory Responses in Mice." *Molecules* 25 (9): 2181. <https://doi.org/10.3390/molecules25092181>.
- DiMartino, M J, G K Campbell, C E Wolff, and N Hanna. 1987. "The Pharmacology of Arachidonic Acid-Induced Rat Paw Edema." *Agents and Actions* 21 (3–4): 303–5.
- Falk, Agneta A, Mats T Hagberg, A E Lof, E M Wigaeus-Hjelm, and Z P Wang. 1990. "Uptake, Distribution and Elimination of Alpha-Pinene in Man after Exposure by Inhalation." *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 16 (5): 372–78. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1771>.
- Gad, Haidy, Eman Al-Sayed, and Iriny Ayoub. 2021. "Phytochemical Discrimination of *Pinus* Species Based on GC–MS and ATR-IR Analyses and Their Impact on *Helicobacter Pylori*." *Phytochemical Analysis*, January, pca.3028. <https://doi.org/10.1002/pca.3028>.
- Gil, Antonio Carlos. 2008. *Métodos e Técnicas de Pesquisa Social*. 6. ed. Editora Atlas SA.
- Hunnskaar, Steinar, and Kjell Hole. 1987. "The Formalin Test in Mice: Dissociation between Inflammatory and Non-Inflammatory Pain." *Pain* 30 (1): 103–14. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1).
- Jansen, C., L.M.N Shimoda, J.K. Kawakami, L. Ang, A.J. Bacani, J.D. Baker, C. Badowski, et al. 2019. "Myrcene and Terpene Regulation of TRPV1." *Channels* 13 (1): 344–66. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1654347>.
- Kim, Taejoon, Bokyeong Song, Kyoung Sang Cho, and Im-Soon Lee. 2020. "Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 2187 21 (6): 2187. <https://doi.org/10.3390/IJMS21062187>.
- Kuehl, Frederick A., and Robert W. Egan. 1980. "Prostaglandins, Arachidonic Acid, and Inflammation." *Science* 210 (4473): 978–84. <https://doi.org/10.1126/science.6254151>.
- Kummer, Raquel, Fernanda Carolina Fachini-Queiroz, Camila Fernanda Estevão-Silva, Renata Grespan, Expedito Leite Silva, Ciomar Aparecida Bersani-Amado, and Roberto Kenji Nakamura Cuman. 2013. "Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrus Latifolia Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/859083>.
- Kunnumakkara, Ajaikumar B., Bano Shabnam, Sosmitha Girisa, Choudhary Harsha, Kishore Banik, Th. Babita Devi, Ruplekha Choudhury, et al. 2020. "Inflammation, NF-KB, and Chronic Diseases: How Are They Linked?" *Critical Reviews in Immunology* 40 (1): 1–39. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2020033210>.
- Lalitha, K. G., and M. G. Sethuraman. 2010. "Anti-Inflammatory Activity of Roots of *Ecbolium Viride* (Forsk) Merrill." *Journal of Ethnopharmacology* 128 (1): 248–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.030>.

- Lam, F. Y., and W. R. Ferrell. 1989. "Inhibition of Carrageenan Induced Inflammation in the Rat Knee Joint by Substance P Antagonist." *Annals of the Rheumatic Diseases* 48 (11): 928–32. <https://doi.org/10.1136/ard.48.11.928>.
- Macedo, E. M.A., W. C. Santos, B. P. Sousa Neto, E. M. Lopes, C. A. Piauilino, F. V.M. Cunha, D. P. Sousa, F. A. Oliveira, and F. R.C. Almeida. 2016. "Association of Terpinolene and Diclofenac Presents Antinociceptive and Anti-Inflammatory Synergistic Effects in a Model of Chronic Inflammation." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 49 (7): 1–10. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165103>.
- Maling, H. M., M. E. Webster, M. A. Williams, W. Saul, and W. Anderson. 1974. "Inflammation Induced by Histamine, Serotonin, Bradykinin and Compound 48-80 in the Rat: Antagonists and Mechanisms of Action." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 191 (2): 300–310. <https://jpet.aspetjournals.org/content/191/2/300.short>.
- Marchand, Serge. 2017. *Neuroimaging of Pain*. Edited by Luca Saba. *Neuroimaging of Pain*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48046-6>.
- Martins, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra, Lindaiane Bezerra Rodrigues, Francisco Rafael Alves Santana Cesário, Maria Rayane Correia de Oliveira, Cicera Datiane Morais Tintino, Fyama Ferreira e. Castro, Isabel Sousa Alcântara, et al. 2017. "Anti-Edematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil from Croton Rhamnifolioides Leaves and Its Major Constituent 1,8-Cineole (Eucalyptol)." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96 (September): 384–95. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.005>.
- Menezes, Isis Oliveira, Jackelyne Roberta Scherf, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Jullyana de Souza Siqueira Quintans, Henrique Douglas Melo Coutinho, Jaime Ribeiro-Filho, and Irwin Rose Alencar de Menezes. 2021. "Biological Properties of Terpinolene Evidenced by in Silico, in Vitro and in Vivo Studies: A Systematic Review." *Phytomedicine* 93 (March): 153768. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153768>.
- O'Mahony, Liam, Mübeccel Akdis, and Cezmi A. Akdis. 2011. "Regulation of the Immune Response and Inflammation by Histamine and Histamine Receptors." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (6): 1153–62. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.051>.
- Opdyke, D. L. J. 1976. "Terpinolene." *Food and Cosmetics Toxicology* 14 (3): 877–78. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(76\)80163-0](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(76)80163-0).
- Patil, Kalpesh R., Umesh B. Mahajan, Banappa S. Unger, Sameer N. Goyal, Sateesh Belemkar, Sanjay J. Surana, Shreesh Ojha, and Chandragouda R. Patil. 2019. "Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-Inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>.
- Sá, Rita de Cássia da Silveira e, Luciana Nalone Andrade, and Damião Pergentino De Sousa. 2013. "A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes." *Molecules* 18 (1): 1227–54. <https://doi.org/10.3390/molecules18011227>.
- Salakhutdinov, Nariman F., Konstantin P. Volcho, and Olga I. Yarovaya. 2017. "Monoterpenes as a Renewable Source of Biologically Active Compounds." *Pure and Applied Chemistry* 89 (8): 1105–17. <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0109>.
- Silva, Mairon Mota, Mariana Carvalho Oliveira, Victor Ferreira Couto, Thaís Madeira Moreira, Yolanda Naime Coelho, and Carlos Pereira Nunes. 2019. "O USO CRÔNICO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS E SEUS EFEITOS ADVERSOS." *Cadernos Da Medicina-UNIFESO* 2 (2).
- "Terpinolene | C10H16 - PubChem." 2021. 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terpinolene#section=Names-and-Identifiers>.
- Tjølsen, Arne, Odd-Geir Berge, Steinar Hunskaar, Jan Henrik Rosland, and Kjell Hole. 1992. "The Formalin

Test: An Evaluation of the Method." *Pain* 51 (1): 5–17.

Tubaro, Aurelia, P Dri, G Delbello, C Zilli, and R Della Loggia. 1986. "The Croton Oil Ear Test Revisited." *Inflammation Research* 17 (3): 347–49.

Umamaheswaran, Sujanitha, Santosh K. Dasari, Peiying Yang, Susan K. Lutgendorf, and Anil K. Sood. 2018. "Stress, Inflammation, and Eicosanoids: An Emerging Perspective." *Cancer and Metastasis Reviews* 37 (2–3): 203–11. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9741-1>.

Vivier, Eric, and Bernard Malissen. 2005. "Innate and Adaptive Immunity: Specificities and Signaling Hierarchies Revisited." *Nature Immunology* 6 (1): 17.

Winter, Charles A, Edwin A Risley, and George W Nuss. 1962. "Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs." *Experimental Biology and Medicine* 111 (3): 544–47. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27849>.

Yaqoob, Parveen. 2003. "Fatty Acids as Gatekeepers of Immune Cell Regulation." *Trends in Immunology* 24 (12): 639–45. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.002>.

Yılmaz, Betül Sever, and Hanefi Özbek. 2018. "Investigation of the Anti-Inflammatory, Hypoglycemic Activity and Median Lethal Dose (Ld50) Level of Limonene in Mice and Rats." *ACTA Pharmaceutica Scientia* 56 (1): 85. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05606>.

Yoon, Weon Jong, Nam Ho Lee, and Chang Gu Hyun. 2010. "Limonene Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide, Prostaglandin E2, and pro-Inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Macrophages." *Journal of Oleo Science* 59 (8): 415–21. <https://doi.org/10.5650/jos.59.415>.

O terpinoleno (1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene | C₁₀H₁₆) (PUBCHEM, 2021) é um monoterpene monocíclico de alta lipofilicidade (FALK *et al.*, 1990), amplamente encontrado na composição de plantas aromáticas como alguns pinheiros (GAD; AL-SAYED; AYOUB, 2021) e outras espécies vegetais. Estudos com diversas atividades farmacológicas de espécies vegetais contendo o terpinoleno são divulgadas, essa ação é consequência da interação entre os compostos presentes no vegetal com alvos no organismo. Para identificação de qual ou quais dessas substâncias são responsáveis ou não pelo efeito observado, é realizada a avaliação individual das presentes no vegetal (modelos experimentais com o composto de forma isolada).

As dúvidas acerca das potencialidades terapêuticas e tóxicas do terpinoleno encorajaram a busca que permitiu especificar, reunir e avaliar as diversas atividades já divulgadas por outros pesquisadores sobre o terpinoleno, como: o perfil tóxico (inseticida, larvicida, nematicida, bactericida, virucida, etc.) e antioxidante. O terpinoleno expressou esse comportamento em vários tipos de organismos vivos, pressupondo-se que são de alto potencial na utilização como repelentes que detenham vetores de enfermidades. De acordo com Ansari; Moraiet e Ahmad (2014), os inseticidas utilizados para conter esses insetos vetores de doenças são de origem sintética e acabam por poluir o meio ambiente e/ou provocar efeitos adversos. Desta forma, em busca de minimizar esses danos, as substâncias de origem natural, como por exemplo o terpinoleno, se mostram muito promissoras por atuar como uma alternativa bioecológica por não promover tantos danos ao meio ambiente.

Estudos *in vitro* (AYDIN; TÜRKEZ; TAŞDEMİR, 2013; CHOI *et al.*, 2000; DE CHRISTO SCHERER *et al.*, 2019; DORMAN *et al.*, 2000; EMAMI *et al.*, 2011; GRASSMANN *et al.*, 2005, 2003; KIM, Hyun-Jin *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2019; RUBERTO; BARATTA, 2000; TURKEZ *et al.*, 2015) relacionaram o terpinoleno com grande potencial antioxidante pela capacidade de inibir ou reduzir as espécies reativas do metabolismo do oxigênio, que são produzidos naturalmente nos diversos organismos em condições fisiológicas normais, entretanto, a ação antioxidante é importante especialmente quando ocorre desregulação dos agentes oxidantes, como em situações de estresse, que podem contribuir com o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas.

A revisão sistemática permitiu correlacionar as propriedades farmacológicas do terpinoleno em experimentações distintas (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*), mas complementares entre si. Dentre elas, identificamos alguns que dados convergiam a uma área de atuação comum, como na elevada mortalidade de pragas e insetos associada à ação sobre a enzima AchE, que foi identificada pela predição de alvo (MENEZES *et al.*, 2021) e mostrou-se coerente com o efeito observado nos animais

(CHANG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2020) e confirmado no perfil de interação do docking molecular (POLITI *et al.*, 2017). Entretanto, há outros possíveis alvos para a interação com o terpinoleno que não possuem comprovação e que tem correlação com uma das vias relacionadas ao processo inflamatório, as enzimas: 5-LOX (lipoxigenase) e COX-1 (ciclooxigenase 1), presentes na cascata do ácido araquidônico, relacionado ao processo inflamatório, recorrentemente presente nas doenças de natureza crônica.

A resposta inflamatória pode ser desencadeada por estímulos endógenos ou exógenos. Essa resposta, foi uma das ações identificadas a partir do artigo de revisão com pouco levantamento disponível até o momento. Levando em consideração que a inflamação é um processo fisiológico importante para reparação de danos e reestabelecimento da homeostase, quando persistente, pode promover intensificação da dor e perda de função (VIVIER; MALISSEN, 2005). Motivados por minimizar os danos inflamatórios persistentes nos indivíduos e por ter encontrado possíveis alvos relacionados às vias da inflamação em ensaios computacionais (MENEZES *et al.*, 2021), conduzimos a avaliação anti-inflamatória em modelo murino. Identificou-se ação significativa contra o edema de orelha induzido por óleo de cróton, no teste de formalina, nos edemas de pata induzidos por carragenina, dextrana, histamina (inibição tardia), ácido araquidônico (AA) e prostaglandina E₂ (PGE₂), sugerindo que os seus efeitos anti-inflamatórios agem por possível ação na via dos eicosanoides, corroborando com os dados da predição (inibição de 5-LOX e COX-1). No modelo de inflamação crônica (implantação de corpo estranho - *pellets* de algodão- no dorso dos animais) foi observado que a dose de 200 mg/kg, foi capaz de reduzir do peso dos *pellets* e o teor de proteínas totais.

A partir dos dados expostos, imagina-se uma propensão a atividade anti-inflamatória mediada pela via dos eicosanoides realizadas pelos edemas de pata por ácido araquidônico e prostaglandina E₂, pela possível ação em receptores de prostaglandinas ou sinalização subjacente (como redução da permeabilidade vascular) e elevação de espécies reativas de oxigênio originadas do processo. Estudos com outros terpenos corroboram com nossas hipóteses ao destacar a atuação na liberação de mediadores pró-inflamatórios, atuando de forma supressora na produção de óxido nítrico (ON) e PGE₂ induzidas por LPS, e expressão de iONS e proteínas COX 2, citocinas TNF- α , IL-1 β , e IL-6 e espécies reativas de oxigênio (EROs) (YOON; LEE; HYUN, 2010). Mesmo havendo limitações metodológicas, esse estudo é inédito e relevante por esclarecer o perfil terapêutico do terpinoleno e encorajar investigações mais específicas para o planejamento de protótipos farmacológicos nas bioatividades mais identificadas e promissoras.

Sendo assim, os artigos resultantes das pesquisas realizadas no período do mestrado foram capazes de facilitar a compreensão mais concisa e coerente com as atividades encontradas, por

demonstrar a larga potencialidade do terpinoleno e atestar sua atividade anti-inflamatória, especialmente no ponto de vista antiedematogênico, acrescentando a viabilidade do terpinoleno como substância ativa para diferentes funcionalidades.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

A partir do presente estudo, constatamos especialmente os efeitos tóxicos e antioxidantes do terpinoleno por meio da revisão sistemática, que evidenciou, além dessas, outras atividades promissoras: sedativo, citotóxico, anti-inflamatório, antiespasmódico, antiproliferativo, inibição de glicoproteína P, citoprotetor, entre outras. Dados sobre a atividade anti-inflamatória de outros terpenos também são apresentados na literatura e, a respeito do terpinoleno, sugerem confirmação de efetividade identificada no modelo agudo e crônico de edema.

Embora sejam necessárias abordagens mais detalhadas em relação às propriedades, vias e mecanismos menos exploradas, esses resultados evidenciam que as funções atribuídas ao terpinoleno são relevantes para alicerçar o entendimento sobre outros possíveis mecanismos de ação, além de auxiliar em novas buscas e definição de estratégias para a utilização desse monoterpene em benefício humano.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Sugerimos uma maior exploração dos parâmetros anti-inflamatórios do terpinoleno, bem como das demais atividades pouco investigadas como: sedativa, citotóxica, antiespasmódica e antiproliferativa. As informações acerca de mais propriedades propiciam subsídios para elencar bioatividades e suas vias orgânicas correlatas de forma a tornar viáveis para o consumo humano. Além disso, a investigação aprofundada da performance fisiológica e farmacocinética é importante para determinar a interação entre esse monoterpene e as membranas biológicas do corpo, favorecendo a compreensão acerca dos perfis de ação desde a absorção à interação com sítios ativos.

ANIMALS, National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 27 Dec. 2011. DOI 10.17226/12910. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>. Accessed on: 1 Oct. 2021.

ANSARI, M Shafiq; MORAIET, Maher Ahmed; AHMAD, Salman. Insecticides: Impact on the Environment and Human Health. **Environmental Deterioration and Human Health**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 99–123. DOI 10.1007/978-94-007-7890-0_6. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7890-0_6.

AYDIN, Elanur; TÜRKEZ, Hasan; TAŞDEMİR, Şener. Anticancer and Antioxidant Properties of Terpinolene in Rat Brain Cells. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, vol. 64, no. 3, p. 415–424, 1 Sep. 2013. DOI 10.2478/10004-1254-64-2013-2365. Available at: <https://content.sciendo.com/doi/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>.

BAKKALI, Fadil; AVERBECK, S.; AVERBECK, Dietrich; IDAOMAR, Mouhamed. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, no. 2, p. 446–475, Feb. 2008. DOI 10.1016/j.fct.2007.09.106. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691507004541>.

BOLTON, Melvin D. Current review: Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 22, no. 5, p. 487–497, 6 May 2009. DOI 10.1094/MPMI-22-5-0487. Available at: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-22-5-0487>. Accessed on: 30 Jan. 2021.

BOLZANI, Vanderlan da S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, vol. 68, no. 1, p. 4–5, 2016. .

BORGES, Cristine Vanz; MINATEL, Igor Otavio; GOMEZ-GOMEZ, Hector Alonzo; LIMA, Giuseppina Pace Pereira. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. [S. l.: s. n.], 2017. p. 259–277, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_15.

BRASIL. Lei Federal nº 11.794 de 2008 sobre Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. 8 Oct. 2008. Available at:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Accessed on: 1 Oct. 2021.

BRASIL. Lei Federal nº 9605 do ano 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. 12 Feb. 1998. Available at: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm. Accessed on: 1 Oct. 2021.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1ª. Brasília/DF: Editora MS / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006. Available at: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Accessed on: 8 Sep. 2021.

CAMPOS, Maria M.; CALIXTO, João B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **British Journal of Pharmacology**, vol. 114, no. 5, p. 1005–1013, Mar. 1995. DOI 10.1111/j.1476-5381.1995.tb13305.x. Available at: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13305.x>. Accessed on: 2 Oct. 2021.

CASANOVA, Livia Marques; COSTA, Sônia Soares. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, vol. 9, no. 2, p. 575–595, 2017. .

CHANG, Kyu-Sik; SHIN, E-Hyun; PARK, Chan; AHN, Young-Joon. Contact and Fumigant Toxicity of *Cyperus rotundus* Steam Distillate Constituents and Related Compounds to Insecticide-Susceptible and -Resistant *Blattella germanica*. **Journal of Medical Entomology**, vol. 49, no. 3, p. 631–639, 1 May 2012. DOI 10.1603/ME11060. Available at: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME11060>.

CHEN, F; KIM, H J; WANG, X; WU, C; CHUNG, H Y; JIN, Z. Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. 2004. **IFT Annual Meeting** [...]. [S. l.: s. n.], 2004. p. 12–16.

CHOI, Hyang Sook; SUN SONG, Hee; UKEDA, Hiroyuki; SAWAMURA, Masayoshi. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 48, no. 9, p. 4156–4161, 2000. <https://doi.org/10.1021/jf000227d>.

CONTI, Barbara; BENELLI, Giovanni; FLAMINI, Guido; CIONI, Pier Luigi; PROFETI, Raffaele; CECCARINI, Lucia; MACCHIA, Mario; CANALE, Angelo. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, vol. 110, no. 5, p. 2013–2021, 9 May 2012. DOI

10.1007/s00436-011-2730-8. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-011-2730-8>.

CUNHA E SILVA, Sandra Lúcia da; GUALBERTO, Simone Andrade; MACEDO, Guadalupe Edilma Licon; SILVEIRA, Thiara Carvalho da; SILVA, Débora Cardoso da. PLANTAS MEDICINAIS USADAS PELA COMUNIDADE DO POVOADO DE LAÇOS

(TANHAÇÚ/BAHIA) E ENCONTRADAS NA FLORESTA NACIONAL CONTENDAS DO SINCORÁ. **Revista Caatinga**, Mossoró, , p. 130–136, Jul. 2012. Available at:

https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/2180/pdf_20. Accessed on: 1 Dec. 2021.

DALBEN, Djeisa; EMMEL, João Luís. A Lei Arouca e os direitos dos animais utilizados em experimentos científicos. **Revista Eletrônica de Iniciação Científica**, vol. 4, no. 4, p. 280–291, 2013. .

DAVIS, Thomas Seth; HORNE, Fiona B.; YETTER, Jens C.; STEWART, Jane E. Engelmann Spruce Chemotypes in Colorado and their Effects on Symbiotic Fungi Associated with the North American Spruce Beetle. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 44, no. 6, p. 601–610, 20 Jun. 2018. DOI 10.1007/s10886-018-0961-1. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-018-0961-1>.

DE CHRISTO SCHERER, Marcella Malavazi; MARQUES, Franciane Martins; FIGUEIRA, Mariana Moreira; PEISINO, Maria Carolina Oliveira; SCHMITT, Elisângela Flávia Pimentel; KONDRATYUK, Tamara P; ENDRINGER, Denise Coutinho; SCHERER, Rodrigo; FRONZA, Marcio. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. **Journal of Tissue Viability**, vol. 28, no. 2, p. 94–99, May 2019. DOI 10.1016/j.jtv.2019.02.003. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965206X18301311>.

DE MARTINO, Laura; NAZZARO, Filomena; MANCINI, Emilia; DE FEO, Vincenzo. Essential oils from Mediterranean aromatic plants. **The Mediterranean Diet**. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 649–661.

DIMARTINO, M J; CAMPBELL, G K; WOLFF, C E; HANNA, N. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat paw edema. **Agents and Actions**, vol. 21, no. 3–4, p. 303–305, 1987. .

DORMAN, H J Damien; FIGUEIREDO, A Christina; BARROSO, José G; DEANS, Stanley G. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 15, no. 1, p. 12–16, 2000. .

DÜRCK, Thorsten; PANTHER, Elisabeth; MÜLLER, Tobias; SORICHTER, Stephan; FERRARI, Davide; PIZZIRANI, Cinzia; DI VIRGILIO, Francesco; MYRTEK, Daniel; NORGAUER,

- Johannes; IDZKO, Marco. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. **International immunology**, vol. 17, no. 5, p. 599–606, 2005. .
- EMAMI, S. A.; ASILI, J.; MALEKIAN, M.; HASSANZADEH, M. K. Antioxidant effects of the essential oils of different parts of platycladus orientalis l. (franco) and their components. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, vol. 14, no. 3, p. 334–344, 2011.
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643943>.
- FÄLDT, Jenny; MARTIN, Diane; MILLER, Barbara; RAWAT, Suman; BOHLMANN, Jörg. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. **Plant Molecular Biology**, vol. 51, no. 1, p. 119–133, Jan. 2003. DOI 10.1023/A:1020714403780. Available at:
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020714403780>. Accessed on: 30 Jan. 2021.
- FALK, Agneta A; HAGBERG, Mats T; LOF, A E; WIGAEUS-HJELM, E M; WANG, Z P. Uptake, distribution and elimination of alpha-pinene in man after exposure by inhalation. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, vol. 16, no. 5, p. 372–378, Oct. 1990. DOI 10.5271/sjweh.1771. Available at: http://www.sjweh.fi/show_abstract.php?abstract_id=1771.
- FAMIANI, Franco; RISCHER, Heiko; OSORIO, Sonia; ES, Sosorio@uma; VALLARINO, José G; POTT, Delphine M. From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. vol. 10, p. 835, 2019. DOI 10.3389/fpls.2019.00835. Available at: www.frontiersin.org.
- FARKAS, J; MOHÁCSI-FARKAS, Cs. Safety of Food and Beverages: Spices and Seasonings. 2014. .
- FELIPE, Lorena O.; BICAS, Juliano L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, vol. 39, no. 2, p. 120–130, 2017. DOI 10.21577/0104-8899.20160068. Available at: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc39_2/04-QS-09-16.pdf.
- FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 147, no. 2, p. 227–235, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x>.
- FRANCISCHETTI, Ieda; MORENO, José Bitu; SCHOLZ, Martin; YOSHIDA, Winston Bonetti. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de**

Cirurgia Cardiovascular, vol. 25, no. 4, p. 575–584, Dec. 2010. DOI 10.1590/S0102-76382010000400023. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382010000400023&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Accessed on: 6 Feb. 2021.

GAD, Haidy; AL-SAYED, Eman; AYOUB, Iriny. Phytochemical discrimination of *Pinus* species based on GC–MS and ATR-IR analyses and their impact on *Helicobacter pylori*. **Phytochemical Analysis**, p. pca.3028, 18 Jan. 2021. DOI 10.1002/pca.3028. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.3028>. Accessed on: 30 Jan. 2021.

GHASEMI, Younes; MOHAGHEGHZADEH, Abdolali; MOSHAVASH, Maryam; OSTOVAN, Zahra; RASOUL-AMINI, Sara; MOROWVAT, Mohammad Hossein; GHOSHON, Mohammad Bagher; RAEE, Mohammad Javad; MOSAVI-AZAM, Seyed Bagher. Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 25, no. 7, p. 1301, 2009. .

GIL, Antonio Carlos. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. [S. l.]: 6. ed. Editora Atlas SA, 2008.

GOMES, Isabelle Sena; CAMINHA, Iraquitan De Oliveira. Guide to systematic review of studies: An option for the methodology of human movement sciences. **Movimento**, Porto Alegre, vol. 20, no. 1, p. 395–411, 2014. DOI 10.22456/1982-8918.41542. Available at: <https://www.seer.ufrgs.br/Movimento/article/view/41542>. Accessed on: 31 Jan. 2021.

GOMES, Renata de Pinho; PIMENTEL, Vitor Paiva; LANDIM, Andre Borges; PIERONI, João Paulo. Ensaio clínico no Brasil: competitividade internacional e desafios. **BNDES Setorial**, vol. 36, no. 36, p. 45–84, 2012. Available at: <http://www.bndes.gov.br/bibliotecadigital>. Accessed on: 31 Jan. 2021.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; SPITZENBERGER, R.; ELSTNER, E.F. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. **Phytomedicine**, vol. 12, no. 6–7, p. 416–423, Jun. 2005. DOI 10.1016/j.phymed.2003.10.005. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711305000346>.

GRASSMANN, Johanna; HIPPELI, Susanne; VOLLMANN, Renate; ELSTNER, Erich F. Antioxidative Properties of the Essential Oil from *Pinus mugo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, no. 26, p. 7576–7582, 17 Dec. 2003. DOI 10.1021/jf030496e. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf030496e>.

GUIMARÃES, Adriana G; QUINTANS, Jullyana S S; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. **Phytotherapy research**, vol. 27, no. 1, p. 1–15, 2013. .

HAMMER, Katherine A; CARSON, Christine Frances; RILEY, T V. Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on Candida albicans, Candida glabrata and Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 53, no. 6, p. 1081–1085, 2004. .

HUERRE, M.R.; GOUNON, P. Inflammation: Patterns and new concepts. **Research in Immunology**, vol. 147, no. 7, p. 417–434, Sep. 1996. DOI 10.1016/S0923-2494(97)84407-0. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923249497844070>.

HUNSKAAR, Steinar; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, vol. 30, no. 1, p. 103–114, Jul. 1987. DOI 10.1016/0304-3959(87)90088-1. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-198707000-00010>.

ISOPRENE | C₅H₈ - PUBCHEM. 2021. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoprene#section=3D-Conformer>. Accessed on: 1 Feb. 2021.

KIM, Hyun-Jin; CHEN, Feng; WU, Changqing; WANG, Xi; CHUNG, Hau Yin; JIN, Zhengyu. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (Melaleuca alternifolia) Oil and Its Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, no. 10, p. 2849–2854, 19 May 2004. DOI 10.1021/jf035377d. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf035377d>.

KIM, Taejoon; SONG, Bokyeong; CHO, Kyoung Sang; LEE, Im-Soon. Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 2187**, vol. 21, no. 6, p. 2187, 22 Mar. 2020. DOI 10.3390/IJMS21062187. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2187/htm>. Accessed on: 12 Oct. 2021.

KIRBY, James; KEASLING, Jay D. Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 60, p. 335–355, 2009. DOI 10.1146/annurev.arplant.043008.091955. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.043008.091955>.

KORDALI, Saban; KOTAN, Recep; MAVI, Ahmet; CAKIR, Ahmet; ALA, Arzu; YILDIRIM, Ali. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicig. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol. 53, no. 24, p. 9452–9458, 2005. .

KROYMANN, Juergen. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 14, no. 3, p. 246–251, 2011. DOI 10.1016/j.pbi.2011.03.021.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>.

L. RUZICKA, Zurich. The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds The Carbon Skeleton of the Sesqui- and Polyterpenes. **EXPERIENTIA**, vol. 9, no. 10, p. 357–396, Oct. 1953. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02167631>. Accessed on: 15 Sep. 2021.

LALITHA, K. G.; SETHURAMAN, M. G. Anti-inflammatory activity of roots of *Ecbolium viride* (Forsk) Merrill. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 128, no. 1, p. 248–250, 2010. DOI 10.1016/j.jep.2009.12.030. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874109007855>.

LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Inhibition of carrageenan induced inflammation in the rat knee joint by substance P antagonist. **Annals of the Rheumatic Diseases**, vol. 48, no. 11, p. 928–932, 1989. <https://doi.org/10.1136/ard.48.11.928>.

LIU, Tai Ti; CHAO, Louis Kuo Ping; HONG, Kai Siang; HUANG, Yi Jhen; YANG, Tsung Shi. Composition and insecticidal activity of essential oil of *Bacopa caroliniana* and interactive effects of individual compounds on the activity. **Insects**, vol. 11, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/insects11010023>.

LU, Qi; HUANG, Nana; PENG, Ying; ZHU, Chunhua; PAN, Siyi. Peel oils from three Citrus species: volatile constituents, antioxidant activities and related contributions of individual components. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 56, no. 10, p. 4492–4502, 22 Oct. 2019. DOI 10.1007/s13197-019-03937-w. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-019-03937-w>.

MACEDO, E. M.A.; SANTOS, W. C.; SOUSA NETO, B. P.; LOPES, E. M.; PIAUILINO, C. A.; CUNHA, F. V.M.; SOUSA, D. P.; OLIVEIRA, F. A.; ALMEIDA, F. R.C. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 49, no. 7, p. 1–10, 2016. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165103>.

MACGLASHAN, Donald. Histamine: A mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 112, no. 4, p. S53–S59, 1 Oct. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(03\)01877-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(03)01877-3).

MAHIZAN, Nik Amirah; YANG, Shun-Kai; MOO, Chew-Li; SONG, Adelene Ai-Lian; CHONG, Chou-Min; CHONG, Chun-Wie; ABUSHELAI, Aisha; LIM, Swee-Hua Erin; LAI, Kok-Song. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. **Molecules**, vol. 24, no. 14, p. 2631, Jul. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.

MAIMONE, Thomas J; BARAN, Phil S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature chemical biology**, vol. 3, no. 7, p. 396, 2007. .

MALING, H. M.; WEBSTER, M. E.; WILLIAMS, M. A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48-80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 191, no. 2, p. 300–310, 1974. Available at: <https://jpet.aspetjournals.org/content/191/2/300.short>. Accessed on: 2 Oct. 2021.

MENDONÇA, Adriana Rodrigues dos Anjos; ANDRADE, Carlos Henrique Vianna de; FLORENZANO, Fábio Herbst. Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa. **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. [S. l.: s. n.], 2006.

MENEZES, Isis Oliveira; SCHERF, Jackelyne Roberta; MARTINS, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra; RAMOS, Andreza Guedes Barbosa; QUINTANS, Jullyana de Souza Siqueira; COUTINHO, Henrique Douglas Melo; RIBEIRO-FILHO, Jaime; DE MENEZES, Irwin Rose Alencar. Biological properties of terpinolene evidenced by in silico, in vitro and in vivo studies: A systematic review. **Phytomedicine**, vol. 93, no. March, p. 153768, Dec. 2021. DOI 10.1016/j.phymed.2021.153768. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153768>.

MEWALAL, Ritesh; RAI, Durgesh K; KAINER, David; CHEN, Feng; KÜLHEIM, Carsten; PETER, Gary F; TUSKAN, Gerald A. Plant-derived terpenes: A feedstock for specialty biofuels. **Trends in biotechnology**, vol. 35, no. 3, p. 227–240, 2017. .

NAPOLI, Edoardo M; SIRACUSA, Laura; SAIJA, Antonella; SPECIALE, Antonio; TROMBETTA, Domenico; TUTTOLOMONDO, Teresa; LA BELLA, Salvatore; LICATA, Mario; VIRGA, Giuseppe; LEONE, Raffaele. Wild Sicilian rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils. **Chemistry & biodiversity**, vol. 12, no. 7, p. 1075–1094, 2015. .

NATHAN, Carl. Fresh approaches to anti-infective therapies. **Science translational medicine**, vol. 4, no. 140, p. 140sr2-140sr2, 2012. .

NATHAN, Carl; DING, Aihao. Nonresolving Inflammation. **Cell**, vol. 140, no. 6, p. 871–882, 19 Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.029>.

OKUMURA, Naoko; YOSHIDA, Hitomi; NISHIMURA, Yuri; KITAGISHI, Yasuko; MATSUDA, Satoru. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. **Oncology letters**, vol. 3, no. 2, p. 321–324, 2012. .

OPDYKE, D. L. J. Terpinolene. **Food and Cosmetics Toxicology**, vol. 14, no. 3, p. 877–878, Jan.

1976. DOI 10.1016/S0015-6264(76)80163-0. Available at:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015626476801630>.

PADUCH, Roman; KANDEFER-SZERSZEŃ, Martyna; TRYTEK, Mariusz; FIEDUREK, Jan.

Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae**

Experimentalis, vol. 55, no. 5, p. 315, 1 Oct. 2007. DOI 10.1007/s00005-007-0039-1. Available at:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-007-0039-1>. Accessed on: 8 Feb. 2021.

PATEL, Seema. Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, vol. 32, no. 7,

p. 1049–1064, 3 Jul. 2015. DOI 10.1080/19440049.2015.1040081. Available at:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2015.1040081>.

PATIL, Kalpesh R.; MAHAJAN, Umesh B.; UNGER, Banappa S.; GOYAL, Sameer N.;

BELEMKAR, Sateesh; SURANA, Sanjay J.; OJHA, Shreesh; PATIL, Chandragouda R. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery

and development of phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 18, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>.

PAVELA, Roman; MAGGI, Filippo; CIANFAGLIONE, Kevin; BRUNO, Maurizio; BENELLI,

Giovanni. Larvicidal Activity of Essential Oils of Five Apiaceae Taxa and Some of Their Main

Constituents Against *Culex quinquefasciatus*. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 15, no. 1, p.

e1700382, Jan. 2018. DOI 10.1002/cbdv.201700382. Available at:

<http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.201700382>.

PEGLOW, Karin; VELLOSO, Caroline. Por que e como utilizar plantas medicinais. **Revista**

Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, vol. 3, no. 3, p. 67–68, Jul.

2002. .

PERVEEN, Shagufta. Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. **Terpenes and Terpenoids**.

[S. l.]: IntechOpen, 2018. p. 13. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79683>.

PINTO, Â.V.; OLIVEIRA, J.C.; COSTA DE MEDEIROS, C.A.; SILVA, S.L.; PEREIRA, F.O.

Potential of antifungal activity of terbinafine by dihydrojasnone and terpinolene against dermatophytes. **Letters in Applied Microbiology**, , p. lam.13371, 20 Nov. 2020. DOI

10.1111/lam.13371. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13371>.

POLITI, Flávio Augusto Sanches; NASCIMENTO, Juliana Damieli; DA SILVA, Alexander Alves;

MORO, Isabela Jacob; GARCIA, Mariana Lopes; GUIDO, Rafael Victório Carvalho; PIETRO,

Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues; GODINHO, Antônio Francisco; FURLAN, Maysa.

Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on common bed bug *Cimex*

lectularius L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1.

Parasitology Research, vol. 116, no. 1, p. 415–424, 12 Jan. 2017. DOI 10.1007/s00436-016-5305-x. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5305-x>.

PONTIN, Mariela; BOTTINI, Rubén; BURBA, José Luis; PICCOLI, Patricia. Allium sativum produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with Sclerotium cepivorum.

Phytochemistry, vol. 115, p. 152–160, Jul. 2015. DOI 10.1016/j.phytochem.2015.02.003.

Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942215000503>.

RICKLIN, Daniel; LAMBRIS, John D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. **The Journal of Immunology**, vol. 190, no. 8, p. 3831–3838, 2013. .

RUBERTO, Giuseppe; BARATTA, Maria T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, vol. 69, no. 2, p. 167–174, May 2000.

DOI 10.1016/S0308-8146(99)00247-2. Available at:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814699002472>.

SÁ, Rita de Cássia da Silveira e; ANDRADE, Luciana Nalone; SOUSA, Damião Pergentino De. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, vol. 18, no. 1, p. 1227–1254, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18011227>.

SAFAEIAN, R.; AMIN, G.; AZARNIVAND, H. STUDY OF CHEMICAL COMPOSITIONS OF THE ESSENTIAL OILS OF AERIAL PARTS OF PRANGOS FERULACEA (L.) LINDLY IN GROWING STAGE IN THE NORTH OF FARS PROVINCE. **Acta Horticulturae**, vol. 964, no. 964, p. 71–76, 31 Oct. 2012. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.964.8. Available at:

https://www.actahort.org/books/964/964_8.htm. Accessed on: 30 Jan. 2021.

SALAKHUTDINOV, Nariman F.; VOLCHO, Konstantin P.; YAROVAYA, Olga I. Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds. **Pure and Applied Chemistry**, vol. 89, no. 8, p. 1105–1117, 26 Jul. 2017. DOI 10.1515/pac-2017-0109. Available at:

<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/pac-2017-0109/html>.

SATO, Tsutomu. Unique Biosynthesis of Sesquiterpenes (C 35 Terpenes). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, vol. 77, no. 6, p. 1155–1159, 23 Jun. 2013. DOI 10.1271/bbb.130180. Available at: <https://academic.oup.com/bbb/article/77/6/1155-1159/5955242>.

SCHMID-SCHÖNBEIN, Geert W. ANALYSIS OF INFLAMMATION. **Annual Review of Biomedical Engineering**, vol. 8, no. 1, p. 93–151, Aug. 2006. DOI

10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708. Available at:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708>.

SHAHRAJABIAN, Mohamad Hesam; SUN, Wenli; CHENG, Qi. Survey on Chemical Constituent , Traditional and Modern Pharmaceutical and Health Benefits of Chinese Star Anise , a Treasure from the East. **Pharmacognosy Communications**, vol. 11, no. January, p. 31–35, 2021. DOI 10.5530/pc.2021.1.7. Available at:

https://www.researchgate.net/profile/M_Hesam_Shahrajabian2/publication/348658558_Survey_on_Chemical_Constituent_Traditional_and_Modern_Pharmaceutical_and_Health_Benefits_of_Chinese_Star_Anise_a_Treasure_from_the_East/links/600982b3299bf14088ae3685/Survey-

SILVA, Mairon Mota; OLIVEIRA, Mariana Carvalho; COUTO, Victor Ferreira; MOREIRA, Thaís Madeira; COELHO, Yolanda Naime; NUNES, Carlos Pereira. O USO CRÔNICO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS E SEUS EFEITOS ADVERSOS. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, vol. 2, no. 2, 2019. .

SINGH, Bharat; SHARMA, Ram A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, vol. 5, no. 2, p. 129–151, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>.

SOGA, Fujiko; KATOH, Norito; INOUE, Tomoko; KISHIMOTO, Saburo. Serotonin Activates Human Monocytes and Prevents Apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 127, no. 8, p. 1947–1955, Aug. 2007. DOI 10.1038/sj.jid.5700824. Available at:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15334928>.

TERPINOLENE | C₁₀H₁₆ - PUBCHEM. 2021. Available at:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terpinolene#section=Names-and-Identifiers>.

Accessed on: 23 Dec. 2020.

THOMAS, JR; NELSON, JK; SILVERMAN, SJ. Métodos de pesquisa em atividade física. 2009.

Available at: [https://books.google.com/books?hl=pt-](https://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=zSTMextTv6sC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Métodos+de+pesquisa+em+atividade+física.&ots=2z687jP2Jr&sig=wBOx8DBzTAVnLSYujWxMIvwhnZw)

[BR&lr=&id=zSTMextTv6sC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Métodos+de+pesquisa+em+atividade+física.&ots=2z687jP2Jr&sig=wBOx8DBzTAVnLSYujWxMIvwhnZw](https://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=zSTMextTv6sC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Métodos+de+pesquisa+em+atividade+física.&ots=2z687jP2Jr&sig=wBOx8DBzTAVnLSYujWxMIvwhnZw). Accessed on: 31 Jan. 2021.

TJØLSEN, Arne; BERGE, Odd-Geir; HUNSKAAR, Steinar; ROSLAND, Jan Henrik; HOLE, Kjell. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, vol. 51, no. 1, p. 5–17, 1992. .

TUBARO, Aurelia; DRI, P; DELBELLO, G; ZILLI, C; LOGGIA, R Della. The croton oil ear test revisited. **Inflammation Research**, vol. 17, no. 3, p. 347–349, 1986. .

TURKEZ, Hasan; AYDIN, Elanur; GEYIKOGLU, Fatime; CETIN, Damla. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro.

Cytotechnology, vol. 67, no. 3, p. 409–418, 4 May 2015. DOI 10.1007/s10616-014-9698-z.

Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-014-9698-z>.

VIVIER, Eric; MALISSEN, Bernard. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nature immunology**, vol. 6, no. 1, p. 17, 2005. .

WINTER, Charles A; RISLEY, Edwin A; NUSS, George W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 111, no. 3, p. 544–547, 1 Dec. 1962. DOI 10.3181/00379727-111-27849. Available at: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-111-27849>.

YOON, Weon Jong; LEE, Nam Ho; HYUN, Chang Gu. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Oleo Science**, vol. 59, no. 8, p. 415–421, 2010. <https://doi.org/10.5650/jos.59.415>.

APÊNDICES

Apêndice 1- Metodologia estendida (METHODX)

1 REVISÃO SISTEMÁTICA

A revisão sistemática foi conduzida de acordo com as diretrizes da *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). Cujo protocolo foi registrado na base de dados pública para o registo de revisões sistemáticas: PROSPERO (*International Prospective Registry of Systematic Reviews*) sob o número de identificação: CRD42021266363 (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>).

1.1 ESTRATÉGIA DE PESQUISA

A pesquisa bibliográfica foi conduzida em quatro bases de dados electrónicas: Embase, Medline/PubMed, Scopus, e Web of Science. Em cada base de dados, foram utilizadas diferentes combinações dos seguintes descritores: terpinolene “AND” activity “OR” properties “OR” therapeutic “OR” treatment. Todos os resultados encontrados em inglês de 1960 a 12 de setembro de 2020 foram considerados e analisados de acordo com as outras etapas da revisão.

1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: (1) os artigos que utilizam ensaios *in silico*, *in vitro*, ou *in vivo* na sua metodologia, (2) a intervenção foi tratamento com terpinoleno puro, (3) grupo de controle: placebo ou grupo não exposto, (4) os artigos devem discutir a atividade biológica do terpinoleno, e (5) devem ser sempre artigos primários (originais).

Foram utilizados os seguintes critérios para excluir os artigos: (1) artigos experimentais contendo apenas estudos clínicos, (2) artigos que apresentam misturas de compostos cuja atividade não é atribuída isoladamente ao terpinoleno, (3) a língua não era o inglês, (4) artigos com textos completos não disponíveis, (5) artigos não publicados até setembro de 2020, (6) artigos sem os descritores elencados, (7) estudos duplicados, e (8) artigos de revisão.

1.3 SELEÇÃO DE ESTUDOS

O primeiro passo foi a pesquisa através dos descritores nas bases de dados escolhidas. Foi realizado o download da lista de artigos contendo informação sobre título, resumo e palavras-chave (não foram utilizados programas específicos para o rastreio e triagem dos artigos), destes foram excluídos os artigos duplicados e os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados por duas investigadoras (IOM e JRS) de forma independente utilizando as diretrizes do PRISMA para avaliar individualmente cada artigo aplicando os critérios de elegibilidade. Quaisquer divergências na seleção dos estudos foram resolvidas por consenso. Em caso de incertezas acerca dos artigos selecionados na triagem inicial, estes tiveram os textos completos (artigos na íntegra) obtidos para análise. Todo o processo de seleção de artigos foi documentado em fluxograma do PRISMA.

1.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS

A extração de dados foi realizada de forma independente por duas investigadoras (IOM e JRS), utilizando uma tabela pré-confeccionada para nortear a extração de dados, e os desacordos durante o preenchimento foram resolvidos por consenso. As atividades comunicadas subdividem-se em *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Para cada subgrupo, foi elaborada uma tabela com informações sobre: (1) autoria, (2) ano, (3) país, (4) metodologia utilizada, (5) via de administração, (6) dose e/ou concentração testada, (7) resultados principais e (8)

atividade biológica. Para cada tabela, foram abordados apenas os dados de extração compatíveis para cada tipo de estudo.

1.5 PREDIÇÃO DOS PERFIS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

A ferramenta online *Swiss TargetPrediction* (<http://Swisstargetprediction.ch/>) foi utilizada para prever alvos de pequenas moléculas de acordo com a sua semelhança 2D ou 3D com ligantes conhecidos.

1.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA DO ESTUDO / RISCO DE VIÉS

O risco de enviesamento e a qualidade metodológica dos estudos *in vivo* (animais não humanos) incluídos foram analisados manualmente por duas investigadoras (IOM e JRS) de forma independente por meio da metodologia SYRCLE's Risk of Bias (RoB) (Hooijmans *et al.*, 2014), e, como a avaliação do risco é um julgamento individual das duas investigadoras de forma independente, foi realizada uma validação final utilizando o índice *kappa*. Esta ferramenta não foi utilizada para analisar estudos *in vitro* ou *in silico*, uma vez que não existe uma ferramenta validada para este tipo de investigação. Após a análise, os estudos foram classificados nas seguintes categorias: "baixo risco de viés", "alto risco de viés" e "risco claro de viés".

1.7 SÍNTESE DE DADOS

Os resultados foram expressos por meio de síntese narrativa, uma vez que a meta-análise não é possível devido à grande heterogeneidade dos estudos abordados na revisão.

2 AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

2.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa foi rigorosamente em conformidade e conduzida em estrita obediência às normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo animais (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011; Lei Federal Nº 11.794, 2008); e integridade da fauna e flora (BRASIL, 1998) (DALBEN; EMMEL, 2013), sendo a mesma aprovada no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob numeração 00346/2019-2.

2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo de caráter experimental randomizado com animais não-humanos, de natureza quantitativa. O instrumento de coleta de dados foi executado através dos modelos farmacológicos *in vivo* para observação dos efeitos das drogas testadas. O método experimental consistiu essencialmente em submeter os objetos de estudo à influência de variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que a variável evidenciou no objeto (GIL, 2008).

2.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), albinos, cepa *Swiss* de ambos os sexos, com massa corpórea delimitada entre 20-30 g, escolhidos randomicamente. Estes foram mantidos acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura entre $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®).

2.4 DOSES UTILIZADAS

A DL_{50} do terpinoleno em ratos por administração oral foi de 4390 mg/kg de terpinoleno (OPDYKE, 1976), portanto, optou-se por utilizar valores inferiores a 10% do valor da DL_{50} , escolhendo-se as doses (50, 100 e 200 mg/kg).

2.5 TESTE DE FORMALINA

Os animais foram divididos em grupos de seis para serem tratados por via oral com água para injeção (controle negativo) ou terpinoleno nas doses de 50 ou 100 ou 200 mg/kg. Após 1 hora os animais foram submetidos a uma injeção de 20 μL de formalina 2,5 % na pata direita (espaço sub-plantar), sendo logo após a aplicação da formalina colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho, com a finalidade de facilitar a observação. O tempo transcorrido (em segundos) que o animal lambeu e/ou mordeu a pata durante as 2 fases: 1ª ou inicial (0-5 min) e 2ª ou tardia (15-30 min) foi registrado por pesquisadores que não estavam responsáveis pela administração medicamentosa ou do agente flogístico (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992).

2.6 EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA

Os animais foram divididos em grupos de seis ($n=6$), que tiveram o volume inicial (V_i) da pata posterior direita e esquerda avaliados por pletismometria (medida basal). Logo em seguida, os animais foram pré-tratados por via oral com água para injeção (controle negativo) ou terpinoleno nas doses 50 ou 100 ou 200 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, os animais receberam carragenina 1% (20 μL) na pata posterior direita e veículo (20 μL) na pata esquerda. O volume das patas traseiras foi registrado por pletismometria após 1, 2, 3 e 4 h da injeção do agente flogístico (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

2.7 EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE DEXTRANA

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6), que tiveram o volume inicial (Vi) da pata posterior direita e esquerda avaliados por pletismometria (medida basal). Logo em seguida, os animais foram pré-tratados por via oral com água para injeção (controle negativo) ou terpinoleno nas doses 50 ou 100 ou 200 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, os animais receberam dextrana 1% (20 µL) na pata posterior direita e veículo (20 µL) na pata esquerda. O volume das patas traseiras de cada animal foi registrado por pletismometria após 1, 2, 3 e 4 h da injeção do agente flogístico (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

2.8 EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE HISTAMINA

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6), que tiveram o volume inicial (Vi) da pata posterior direita e esquerda avaliados por pletismometria (medida basal). Logo em seguida, os animais foram pré-tratados por via oral com água injetável (controle negativo) e via oral da dose 200 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, os animais receberam histamina a 1% (20 µL) na pata posterior direita e veículo (20 µL) na pata esquerda. O volume das patas traseiras (direita e esquerda) de cada animal foi registrado por pletismometria após 30, 60, 90, 120 e 180 min da injeção do agente flogístico (MALING *et al.*, 1974).

2.9 EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6), que tiveram o volume inicial (Vi) da pata posterior direita e esquerda avaliados por pletismometria (medida basal). Logo em seguida, os animais foram pré-tratados por via oral com água injetável (controle negativo) e via oral da dose 200 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, os animais receberam ácido araquidônico a 1% (20 µL) na pata posterior direita e veículo (20 µL) na pata esquerda. O volume das patas traseiras (direita e esquerda) de cada animal foi registrado por pletismometria após 15, 30, 45, 60 e 90 min da injeção do agente flogístico (DIMARTINO *et al.*, 1987).

2.10 EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE PROSTAGLANDINA E₂

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6), que tiveram o volume inicial (Vi) da pata posterior direita e esquerda avaliados por pletismometria (medida basal). Logo em seguida, os animais foram pré-tratados por via oral com água injetável (controle negativo) e via oral da dose 200 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, receberam prostaglandina E₂ (3nmol/pata) (20 µL) na pata posterior direita e veículo (20 µL) na pata esquerda. O volume das patas traseiras (direita e esquerda) de cada animal foi registrado por pletismometria após 15, 30, 45 e 60 min da injeção do agente flogístico (CAMPOS; CALIXTO, 1995).

2.11 MENSURAÇÃO DE EDEMA DE PATA

A expressão dos resultados foram obtidos pelas diferenças entre o volume final e o volume inicial (antes da injeção do agente flogístico) da pata direita e esquerda de cada tempo, calculados na fórmula: $V_e = V_f - V_i$, sendo: V_e = volume do edema (em ml), V_f = volume final e V_i = volume inicial (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

2.12 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO ÚNICA DE ÓLEO DE CRÓTON

Os animais foram divididos em grupos de seis (n=6) para pré-tratamento das orelhas direitas topicamente com água injetável (controle negativo), ou concentrações 5 ou 10 ou 20 mg/mL do terpinoleno (aplicações de 20 µL, sendo: 10 µL face externa e 10 µL face interna das orelhas), esperando 15 minutos para absorção. Após 1 hora, foi aplicado 20 µL do agente flogístico óleo de cróton 5% (v/v) diluído em acetona nas orelhas direitas e 20 µL do veículo nas orelhas esquerdas. Decorridas 6 horas, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical para posterior retirada das orelhas, cortadas em discos de 6 mm de

diâmetro com *punch* (perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (TUBARO *et al.*, 1986).

2.13 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA E DO EFEITO INIBITÓRIO MÉDIO

Os discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas direitas (tratamento com o agente flogístico) e das esquerdas (tratadas com o veículo) foram pesados e utilizados na quantificação do percentual de inflamação em cada animal analisado. O edema de orelha, evidenciado em percentual de acréscimo na massa da orelha, mensurado em balança analítica, foi calculado pela fórmula:

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de edema

$$\text{Percentual de edema (\%)} = \frac{\text{MOD} - \text{MOE}}{\text{MOE}} \times 100$$

Sendo:

MOD = massa (em gramas) do disco da orelha direita

MOE = massa (em gramas) do disco da orelha esquerda.

O efeito inibitório médio da inflamação (EIM, em %) de cada tratamento, foi calculado pela fórmula:

Equação 2 - Cálculo para efeito inibitório médio

$$\text{EIM (\%)} = \frac{\text{MPEcont} - \text{MPEtrat}}{\text{MPEcont}} \times 100$$

Sendo:

MPEcont (em %) = média do percentual de edema do grupo controle submetido ao tratamento com água para injeção.

MPEtrat (em %) = média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento ao terpinoleno.

2.14 GRANULOMA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE *PELLETS* DE ALGODÃO

Os animais foram previamente anestesiados com 80 mg/kg de quetamina e 20 mg/kg de xilazina (anasedan) para serem submetidos a cirurgia através de uma pequena incisão dorsal para implantação de quatro *pellets* de algodão (posicionados tanto no lado direito como esquerdo dos quadrantes superior e inferior do dorso dos animais). Após a sutura, os animais foram divididos em três grupos; (1) 10 mg/kg de água para injeção (controle negativo), (2) 5mg/kg de dexametasona (controle positivo) e (3) terpinoleno 200 mg/kg por via oral, durante dez dias consecutivos a partir do dia de implante dos *pellets*. No décimo primeiro dia, os animais foram submetidos a eutanásia, e os blocos de algodão, com o tecido fibrovascular circundante, foram removidos, e postos durante 12 horas em liofilizador para a secagem dos *pellets* e, em seguida, determinado o peso dos *pellets*. Os resultados foram expressos como a diferença entre o peso seco inicial (40mg, 10mg cada bloco de algodão) e final. Após as medidas do peso seco dos *pellets*, eles foram colocados em tubos de ensaios, separados por grupos e animais, foi feito homogenato com 1 mL de solução salina 0,9% para posterior dosagem de proteínas totais por espectrofotometria (LALITHA; SETHURAMAN, 2010).

2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises efetuadas foram avaliados tomando como base à média e seu correspondente erro padrão da media (E.P.M.). A análise estatística utilizada foi ANOVA,

utilizando o software *Prism for Windows* (*GraphPad Software*). Foram consideradas diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comissão de Ética.



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propg@urca.br - www.urca.br/ceua



Declaração

Declaro para devidos fins, que o projeto intitulado "**Avaliação da atividade anti-inflamatória do monoterpeno isolado terpinoleno e complexo de inclusão terpinoleno/ β - ciclodextrina em modelos animais.**"- processo 00346/2019-2 foi **APROVADO** pela Comissão de Experimentação e Uso de animais-CEUA-URCA.

Roseli Barbosa

Coordenadora do CEUA-URCA

Crato-29-01-2020

Artigo publicado

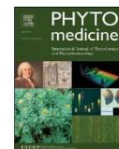
Phytomedicine 93 (2021) 153768



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phymed



Review

Biological properties of terpinolene evidenced by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies: A systematic review



Isis Oliveira Menezes^a, Jackelyne Roberta Scherf^b, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a, Andreza Guedes Barbosa Ramos^a, Jullyana de Souza Siqueira Quintans^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^d, Jaime Ribeiro-Filho^e, Irwin Rose Alencar de Menezes^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry - LFQM, Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE 63105-000, Brazil

^b Antibiotics department - DB, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE 50670 901, Brazil

^c Department of Physiology - DFS, Federal University of Sergipe - UFS, São Cristóvão, SE 49100-000, Brazil

^d Microbiology and Molecular Biology Laboratory - LMBM, Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE 63105-000, Brazil

^e Laboratory of Investigation in Genetics and Translational Hematology, Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, BA 40296-710, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Terpinolene
Biological properties
Systematic review
PRISMA guidelines

ABSTRACT

Background: Terpinolene, a monoterpene that is naturally found in a variety of herbs, is widely used as a flavoring agent in the industry. Although it's well established in the literature that terpinolene is an important component of plant extracts, the biological properties and the potential therapeutic use of this compound remain poorly explored.

Purpose: This work aimed to answer the following guiding question: "What are the biological activities of terpinolene demonstrated through *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* assays?"

Study design and methodology: A systematic review was carried out in four electronic databases (Embase, Web of Science, Scopus, and PubMed) according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines, using the following search terms: terpinolene "AND" activity "OR" properties "OR" therapeutic "OR" treatment. This search included manuscripts published between 1960 and June 2020. Study selection was conducted by two independent reviewers according to predefined criteria.

Results: The initial search found a total of 2449 articles. However, only 57 of them were selected as they met the inclusion criteria and answered the guiding question. The analysis of these studies indicated that terpinolene presents a series of biological effects, from which the antioxidant, larvicide, and insecticide activities stand out. Despite the evidence demonstrating that terpinolene has the potential to be used in a broad pharmacological context, the mechanisms underlying its cellular and molecular effects remain to be better elucidated. In addition, the *in vivo* efficacy and safety of the administration of this compound have been poorly evaluated through either preclinical and clinical trials. Therefore, this study highlights the importance of characterizing the biological aspects and mechanisms of action of this natural compound.

Conclusion: The data summarized in the present systematic review demonstrates the pharmacological potential of terpinolene. Nevertheless, most studies included in this review provide a superficial characterization of terpinolene biological effects and therefore, further research elucidating its mechanism of action and potential therapeutic benefits through preclinical and clinical trials are required. Nevertheless, due to its wide range of

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; CFA, complete freud's adjuvant; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (free radical elimination test); EC50, concentration of a drug that gives half-maximal response; EtBr, ethidium bromide absorption assay; FRAP, ferric reducing / antioxidant power; HEWLs, hen egg white lysozyme; IC50, concentration of drug required for 50% inhibition; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry; LC50, lethal concentration of 50% animal exposed; LC90, lethal concentration of 90% animal exposed; LDH, lactate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; MIC, minimum Inhibitory concentration; MTT, cell viability assay; NBT, nitro blue atrazolium reduction assay; NDMA, N-nitrosodimethylamine; NF-kB, nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells; NO, nitric oxide; PRISMA, preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses; RoB, risk of bias; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SCGE, single cell gel electrophoresis; SEM, scanning electron microscopy; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; ThT, thioflavin T; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; TOC, total oxidant capacity; TOS, total oxidant status.

* Corresponding author.

E-mail address: irwin.alencar@urca.br (I.R.A. de Menezes).

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153768>

Received 8 March 2021; Received in revised form 16 August 2021; Accepted 16 September 2021

Available online 26 September 2021

0944-7113/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153768>

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711321003111>

Trabalhos apresentados em eventos

XIII Curso de Inverno em
Imunologia

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO TERPINOLENO NO MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA**", de autoria de Isis O. Menezes, Lucas Y. S. da Silva, Renata T. Pessoa, Cícero P. da S. Júnior, Eduardo dos S. Silva, Andreza G. B. Ramos, Anita O. B. P. B. Martins e Irwin R. A. de Menezes, foi apresentado na modalidade oral por *Isis Oliveira Menezes* no **XIII Curso de Inverno em Imunologia**, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no dia 21 de julho de 2021.


Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida
Comissão Organizadora do XIII Curso de Inverno em Imunologia


Profª Drª Vânia Luiza Deperon Bonato
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada



V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA
XXIII Semana de Iniciação Científica da URCA | 7 A 11 DE DEZEMBRO/2020
Os impactos e desafios da pandemia pela COVID-19 no ensino, pesquisa e extensão

Certificado

Certificamos que **MELISSA HELEN LOPES BRITO, ISIS OLIVEIRA MENEZES, MARIA RAYANE CORREIA DE OLIVEIRA, RENATA TORRES PESSOA, LUCAS YURE SANTOS DA SILVA, ANITA OLIVEIRA BRITO PEREIRA BEZERRA MARTINS, ANDREZA GUEDES BARBOSA RAMOS, IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES, N/I**, apresentou(aram) comunicação intitulada: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO MONOTERPENO TERPINOLENO**, durante o(a) **V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA e XXIII Semana de Iniciação Científica da URCA**, com o tema: **OS IMPACTOS E DESAFIOS DA PANDEMIA PELA COVID-19 NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, evento realizado pelo(a) Universidade Regional do Cariri, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, no período de 07 a 11 de dezembro de 2020.

 **URCA**
Universidade Regional do Cariri
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

 **GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia e Educação Superior


Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa

Anexo 3 – Outros anexos de produção científica extra realizados durante o período do mestrado.

Artigo publicado

DOI: 10.19095/rec.v8i2.828

ORIGINAL

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR DOS EXTRATOS METANÓLICO E HEXÂNICO DAS ENTRECASCAS DE *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (MALVACEAE)

STUDY OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY POTENTIAL OF THE METHANOLIC AND HEXANE EXTRACTS OF THE INNER BARKS OF *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (MALVACEAE)

Isis Oliveira Menezes¹
Valéria Christina Romualdo Calou²
Raimundo Luiz Silva Pereira³
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa⁴
Débora Feitosa Muniz⁵
Saulo Relison Tintino⁶
Henrique Douglas Melo Coutinho⁷
João Tavares Calixto Júnior⁸
Aracélio Viana Colares⁹

Trabalhos apresentados em eventos



XIII Curso de Inverno em Imunologia
CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DA *Ximenia americana* L. POR MEIO DO ENSAIO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS**", de autoria de Renata T. Pessoa , Lucas Y. S. Silva , Maria R. C. Oliveira , Isabel S. Alcântara , Roger H. S. Costa , Isis O. Menezes , Anita O.B.P. B. Martins, Irwin R. A. Menezes, foi apresentado na modalidade oral por *Renata Torres Pessoa* no **XIII Curso de Inverno em Imunologia**, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no dia 21 de julho de 2021.


Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida
Comissão Organizadora do XIII Curso de Inverno em Imunologia


Prof^a Dr^a Vânia Luiza Deperon Bonato
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

XIII SIMPOSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA

Verifique o código de autenticidade: 1917246.806491.286359.8.3075946248305649136 em <https://www.even3.com.br/d/documentos>

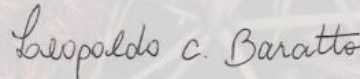
CERTIFICADO

EVENTO ONLINE
12 A 15/OUTUBRO/2021

Certificamos que o trabalho intitulado **AValiação dos possíveis mecanismos do isopulegol e do isopulegol complexado em B/CD por meio do ensaio de edema de pata induzido por histamina** de autoria de Cicero Pedro Da Silva Junior, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Maria Sanadia Alexandre da Silva, RENATA TORRES PESSOA, Lucas Yure Santos da Silva, Isis Oliveira Menezes, Maria Rayane Correia de Oliveira, ANITA OLIVEIRA BRITO PEREIRA BEZERRA MARTINS, Irwin Rose Alencar de Menezes (URCA) e Lucindo José Quintans Júnior, foi apresentado no evento **XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, realizado em 12/10/2021 a 15/10/2021, na cidade de São Cristóvão, contabilizando carga horária total de 30 horas.



PROF. DR. LUCINDO QUINTANS JUNIOR
PRESIDENTE DA COMISSÃO ORGANIZADORA



PROF. DR. LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO
PRESIDENTE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA



V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIII Semana de Iniciação Científica da URCA | 7 A 11 DE DEZEMBRO/2020

Os impactos e desafios da pandemia pela COVID-19 na ensino, pesquisa e extensão

Certificado

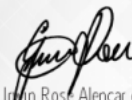
Certificamos que **EDUARDO DOS SANTOS SILVA, ANITA OLIVEIRA BRITO PEREIRA BEZERRA MARTINS, MARIA RAYANE CORREIA DE OLIVEIRA, ISABEL SOUSA ALCANTARA, MARIA SANADIA ALEXANDRE, FRANCISCO LUCAS ALVES BATISTA, ISIS OLIVEIRA MENEZES, IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES, N/I**, apresentou(aram) comunicação intitulada: **AValiação do efeito anti-edeMATOGÊNICO do complexo de inclusão do óleo essencial de Croton rhamnifolioides com β -CICLODEXTRINA**, durante o(a) V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA e XXIII Semana de Iniciação Científica da URCA, com o tema: **OS IMPACTOS E DESAFIOS DA PANDEMIA PELA COVID-19 NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, evento realizado pelo(a) Universidade Regional do Cariri, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, no período de 07 a 11 de dezembro de 2020.



URCA
Universidade Regional do Cariri
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior



Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa



II CONGRESSO CIENTÍFICO DE JUAZEIRO DO NORTE ONLINE

CERTIFICADO

Certificamos que **KARLA VANESSA CUNHA DE ARAÚJO, PAULA FRASSINETTE AZEVEDO PEREIRA, LIZ OLIVEIRA MENEZES, LUIZ ROCLAYTON N. BASTOS** apresentaram o trabalho intitulado: **“USO DO ETOMIDATO COMO SUBSTITUTIVO DO PROPOFOL NA INDUÇÃO ANESTÉSICA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA”** com a orientação de **ISIS OLIVEIRA MENEZES** na modalidade oral, no II Congresso Científico de Juazeiro do Norte (Online), realizado nos dias 07 a 10 de outubro de 2020.

Juazeiro do Norte, 10 de outubro de 2020.



José Marcos de Macêdo Landim
JOSE MARCOS DE MACÊDO LANDIM
REITOR

UNIJUAZEIRO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE JUAZEIRO DO NORTE

Milena Drumond Ramos Santana
MILENA DRUMOND RAMOS SANTANA
PRÓ-REITORA DE ENSINO



**I SIMPÓSIO INTERNACIONAL
ONLINE DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL**
O elo indissociável entre a
saúde humana, animal e
ambiental

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **“Ocorrências de tumor venéreo transmissível extragenital e metastático em cães: uma revisão sistemática”**, de autoria de **Luiz Roclayton Nogueira Bastos, Liz Oliveira Menezes, Karla Vanessa Cunha de Araújo, Isis Oliveira Menezes, Geni Oliveira Lopes**, foi apresentado no I Simpósio Internacional Online do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, realizado no período de 17 a 19 de agosto de 2020.

CAUS
oficial

DocuSigned by:

Andréa Costa

A4DC3A20B1F142D...

Profa Dra. Andréa Pereira da Costa

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA/UEMA



DocuSign Envelope ID: C2865E9D-5508-478C-883A-F4CF245C8E45



I SIMPÓSIO INTERNACIONAL
ONLINE DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL
O elo indissociável entre a
saúde humana, animal e
ambiental

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **“Erros na administração de ferro em cães anêmicos”**, de autoria de **Liz Oliveira Menezes, Luiz Roclayton Nogueira Bastos, Karla Vanessa Cunha de Araújo, Isis Oliveira Menezes, Geni Oliveira Lopes**, foi apresentado no I Simpósio Internacional Online do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, realizado no período de 17 a 19 de agosto de 2020.

DocuSigned by:
Andréa Costa
A4DC3A20B1F142D...

Profa Dra. Andréa Pereira da Costa

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA/UEMA



DocuSign Envelope ID: C2865E9D-5508-478C-883A-F4CF245C8E45



I SIMPÓSIO INTERNACIONAL
ONLINE DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL
O elo indissociável entre a
saúde humana, animal e
ambiental

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **“Contribuição do médico veterinário na saúde pública a partir da prevenção e diagnóstico da diotofimatoze”**, de autoria de **Karla Vanessa Cunha de Araújo, Liz Oliveira Menezes, Luiz Roclayton Nogueira Bastos, Isis Oliveira Menezes, Geni Oliveira Lopes**, foi apresentado no I Simpósio Internacional Online do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, realizado no período de 17 a 19 de agosto de 2020.

DocuSigned by:
Andréa Costa
A4DC3A20B1F142D...

Profa Dra. Andréa Pereira da Costa

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA/UEMA



DocuSign Envelope ID: C2865E9D-5508-478C-883A-F4CF245C8E45



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP



XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Certificamos que **ISIS OLIVEIRA MENEZES, ANDREZA GUEDES BARBOSA RAMOS, RENATA TORRES PESSOA, CÍCERO PEDRO DA SILVA JÚNIOR, MARIA SANADIA ALEXANDRE DA SILVA, MARIA RAYANE CORREIA DE OLIVEIRA, LUCAS YURE SANTOS DA SILVA, LUCINDO QUINTANS JÚNIOR, IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES**, apresentou(aram) comunicação PÓSTER intitulada: **AValiação DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO ISOPULEGOL E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO NO MODELO DA FORMALINA**, durante o(a) **IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA - XXII Semana de Iniciação Científica da URCA e VII Semana de Extensão**, evento realizado pelo(a) Universidade Regional do Cariri, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, no período de 21 a 25 de Outubro de 2019.

Irwin Rose Alencar de Menezes
Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa - PRPGP



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP



XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Certificamos que **CÍCERO PEDRO DA SILVA JÚNIOR, LINDAIANE BEZERRA RODRIGUES DANTAS, KAIO JEFTE SANTOS DE OLIVEIRA DIAS, RENATA TORRES PESSOA, ISABEL SOUSA DE ALCÂNTARA, ISIS OLIVEIRA MENEZES, MARIA RAYANE CORREIA DE OLIVEIRA, ANITA OLIVEIRA PEREIRA BRITO MARTINS, IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES**, apresentou(aram) comunicação ORAL intitulada: **ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA TÓPICA DOS COMPOSTOS (+)-NOOTKATONE E (+)-VALENCENE EM CAMUNDONGOS**, durante o(a) **IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA - XXII Semana de Iniciação Científica da URCA e VII Semana de Extensão**, evento realizado pelo(a) Universidade Regional do Cariri, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, no período de 21 a 25 de Outubro de 2019.

Irwin Rose Alencar de Menezes
Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa - PRPGP