



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



ROBSON ARAUJO DE FREITAS JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
YLANG-YLANG (*Cananga odorata*) SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA EM MODELOS EXPERIMENTAIS
*IN VITRO E IN VIVO***

ROBSON ARAUJO DE FREITAS JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
YLANG-YLANG (*Cananga odorata*) SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA EM MODELOS EXPERIMENTAIS
*IN VITRO E IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE YLANG-YLANG (*Cananga odorata*) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 03 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Robson e Claudia, por sempre acreditarem em mim e por terem dedicado uma vida ao meu bem-estar e estudos.

A todos os Professores, com que tive a oportunidade de aprender um pouco, sem eles eu não estaria aqui.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado até aqui, tanto com saúde física e mental para enfrentar tanto os pequenos problemas como os grandes (pandemia), me motivou e deu apoio a continuar todos os dias, me levantando quando desistia, sem Ele nada disso poderia ser concluído, sequer iniciado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Euclides, que me recebeu, me deu a oportunidade e aceitou me orientar antes mesmo de me conhecer, me orientou os melhores caminhos e me ensinou a ser melhor como pessoa, tanto na academia como na vida profissional, e além de orientador foi um amigo.

Agradeço a minha família que me deu todo o suporte desde financeiro, amoroso e conselheiro. O carinho em especial dos meus pais, Robson e Claudia, que foram meus amigos, meu suporte, minha força para concluir tudo isso. Aos meus amigos que me ouviram por diversas vezes falar sobre meu trabalho, me aconselharam, me divertiram e deixaram tudo mais leve.

Aos integrantes do LABFAR/FACFAN, como a Profa. Dra. Monica Cristina, que forneceu o espaço, material, aparelhos e esteve a disposição para que esse trabalho fosse executado e concluído com êxito. A Illuska Senna, que mesmo de longe me ajudou a conhecer o laboratório, a Joyce Lencina que me ajudou com as metodologias do laboratório, a Paloma Kênia, que me ajudou nos ensaios e aos estudantes que participaram da iniciação científica (PIBIC), além de companheiros de laboratório, ganhei amigos.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e a Universidade Estadual de Maringá por disponibilizarem toda a estrutura e suporte, desde as instalações até o quadro de docentes que estiveram disponíveis e contribuíram com seus respectivos laboratórios em parceria para a conclusão desse trabalho, em especial aos Professores: Dra. Denise Brentan, Dr. Roberto Cuman e Dra. Cândida Kassuya.

Em especial aos animais utilizados para a conclusão do trabalho, sem eles nada seria possível, toda evolução e conhecimento científico se deve a doação completa deles.

E por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que forneceu suporte financeiro para a execução desse trabalho.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

Conforme as normas fixadas pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, esta dissertação é composta de uma introdução geral sobre o trabalho, uma revisão de literatura sobre o tema abordado, justificativa para realização da pesquisa, objetivos da pesquisa e um artigo científico.

O artigo científico resultante da pesquisa realizada foi redigido seguindo as normas de formatação do periódico ao qual foi submetido (*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; Fator de Impacto JCR 2,629; Qualis/CAPES A3).

RESUMO

FREITAS JUNIOR, Robson Araujo. Avaliação do efeito do óleo essencial de ylang-ylang (*Cananga odorata*) sobre a resposta inflamatória aguda em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RESUMO

A *Cananga odorata*, popularmente conhecida como ylang-ylang, é uma planta medicinal pertencente à família Annonaceae, com diversas propriedades e atividades biológicas já descritas na literatura, tais como: ansiolítica, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras. O objetivo deste estudo foi determinar a composição química, a toxicidade aguda oral e o efeito do óleo essencial de ylang-ylang (OEY) sobre a resposta inflamatória aguda em modelos experimentais. Para a análise fitoquímica, o OEY foi analisado por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Nos ensaios *in vitro*, foi avaliada a citotoxicidade do OEY por meio do teste de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT); o efeito do OEY na quimiotaxia de neutrófilos induzida por *N*-formil metionil leucil fenilalanina (fMLP); e na de atividade fagocitária de neutrófilos. O OEY foi administrado por via oral nos ensaios de peritonite induzida por zymosan, de microcirculação *in situ*, sobre o rolamento e adesão de leucócitos induzidos por carragenina, e nos modelos de edema de pata e de hiperalgesia induzidos por carragenina. O OEY (na dose 2000 mg/kg) também foi testado na toxicidade aguda em camundongos. O OEY apresentou predominância de acetato de benzila, linalol, benzoato de benzila e benzoato de metila, em sua constituição. Nos testes *in vitro*, o OEY não apresentou citotoxicidade, reduziu a quimiotaxia de neutrófilos induzida por fMLP nas concentrações de 10, 30, 60 e 90 µg/mL, e nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL; reduziu a atividade fagocitária de neutrófilos. O tratamento oral com OEY nas doses de 100 e 200 mg/kg reduziu o recrutamento de leucócitos e a produção de óxido nítrico (NO) no modelo de peritonite induzida por zymosan, reduziu o rolamento e adesão de leucócitos induzidos por carragenina na microcirculação *in situ* e reduziu o edema e hiperalgesia mecânica induzidos por carragenina. O OEY não apresentou sinais de toxicidade no teste de toxicidade aguda. Em conclusão, o OEY reduziu a ativação leucocitária, apresentando propriedades antiedematogênicas, anti-hiperalgésicas e anti-inflamatórias em modelos experimentais. O NO pode estar envolvido no mecanismo de ação do OEY, porém as demais vias inflamatórias não podem ser descartadas.

Palavras-chave: ylang-ylang, resposta inflamatória, anti-inflamatório, produtos naturais.

ABSTRACT

FREITAS JÚNIOR, Robson Araújo. Evaluation of ylang-ylang (*Cananga odorata*) essential oil effects on the acute inflammatory response in experimental models *in vitro* and *in vivo*. Dissertation (Masters in Biotechnology). Federal University of Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

Ylang-ylang (*Cananga odorata*) is a medicinal plant of the Annonaceae family, with many therapeutic properties and biological activities, such as anxiolytic, antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activities, among others. The aim of this study was to evaluate the chemical composition, oral acute toxicity, and the effect of ylang-ylang essential oil (YEO) on the acute inflammatory response in experimental models. YEO was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. For *in vitro* tests, YEO was evaluated in methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) test, neutrophil chemotaxis induced by *N*-formyl methionyl leucyl phenylalanine (fMLP), and phagocytic activity tests. The YEO was orally administered in zymosan-induced peritonitis, carrageenan-induced leukocyte rolling and adhesion events in the *in situ* microcirculation model, and carrageenan-induced paw oedema models. The YEO (2000 mg/kg) was also tested in acute toxicity test in *Swiss* mice. YEO showed predominance of benzyl acetate, linalool, benzyl benzoate, and methyl benzoate. YEO did not present *in vitro* cytotoxicity. YEO at concentrations of 10, 30, 60 and 90 µg/mL reduced the *in vitro* neutrophil chemotaxis induced by fMLP, and at concentrations of 10, 30, and 90 µg/mL, reduced the phagocytic activity. The oral treatment with YEO at doses of 100 and 200 mg/kg reduced the leukocyte recruitment, nitric oxide (NO) production in zymosan-induced peritonitis model, reduced rolling and adherent leukocyte number induced by carrageenan in the *in situ* microcirculation, and reduced carrageenan-induced edema and mechanical hyperalgesia. YEO did not present signs of toxicity in acute toxicity test. In conclusion, YEO affected the leukocyte activation, presented antiedematogenic, anti-hyperalgesic and anti-inflammatory properties in experimental models. NO may be involved in OEY mechanism of action, but other inflammatory pathways cannot be ruled out.

Keywords: ylang-ylang, acute inflammation, anti-inflammatory, natural products.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Morfologia da planta <i>Cananga odorata</i>	32
Figura 2 - Mecanismos de migração de leucócitos através do endotélio.....	35
Figura 3 - Etapas da fagocitose.....	37

ARTIGO

Figure 1 - Chromatogram of the <i>Cananga odorata</i> essential oil (YEO).....	60
Figure 2 - Effect of YEO on <i>in vitro</i> neutrophils chemotaxis.....	62
Figure 3 - Effect of YEO on phagocytic activity of neutrophils.....	63
Figure 4 - Effect of YEO treatment on migrated leukocyte number and NO production for peritoneal cavity of <i>Swiss</i> mice 6 hours after zymosan-induced peritonitis.....	64
Figure 5 - Effect of YEO on leukocyte rolling and adhesion induced by carrageenan.....	65
Figure 6 - Effect of YEO treatments on carrageenan-induced paw edema in mice.....	66
Figure 7 - Effect of YEO treatments on carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in <i>Swiss</i> mice.....	67

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 - Chemical composition of <i>Cananga odorata</i> essential oil.....	61
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

OEY: óleo essencial de ylang-ylang

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

OMS: organização mundial da saúde

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS: Sistema Único de Saúde

SNC: Sistema Nervoso Central

FEMA: Associação dos Fabricantes de Aromas e Extratos (do inglês *Flavor and Extract Manufacturers Association*)

TNF: fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

PMNs: leucócitos polimorfonucleares

ERO: espécies reativas de oxigênio

NO: óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

IL: interleucina

COX-1: ciclooxigenase 1

COX-2: ciclooxigenase 2

TGF- β : fator de transformação de crescimento-beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzida (do inglês *inducible nitric oxide synthase*)

GPCRs: receptores acoplados à proteína G

ICAM: moléculas de adesão intercelular

VCAM: moléculas de adesão vascular

PG: Prostaglandina

LT: Leucotrieno

fMLP: *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (do inglês *N-formyl methionyl leucyl phenylalanine*)

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (do inglês *methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*)

YEO: do inglês *ylang-ylang essential oil*

NSAIDS: do inglês *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*

GC/MS: do inglês *Gas chromatography/Mass Spectrometry*

DMSO: dimetilsulfóxido

BSA: albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

PBS: tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

NMR: ressonância magnética nuclear (do inglês *nuclear magnetic resonance*)

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)

PI-3K: fosfoinosítideo 3-quinase (do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*)

LD₅₀: dose letal média (do inglês *median lethal dose*)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1. Produtos Naturais e Plantas Medicinais	29
2.2. Óleos Essenciais	30
2.3. Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>)	31
2.4. Resposta Inflamatória e Mediadores Inflamatórios	33
2.5. Fagocitose	36
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo Geral	42
4.2. Objetivos Específicos	42
5. REFERÊNCIAS	43
6. ARTIGO	51
6.1. Introduction	54
6.2. Material and Methods	55
6.2.1. Chemicals and drugs	55
6.2.2. Analysis of the essential oil and compound identification	55
6.2.3. Animals	56
6.2.4. Leukocyte preparation for <i>in vitro</i> assays	56
6.2.5. Cell viability analysis (MTT assay)	56
6.2.6. <i>In vitro</i> neutrophil chemotaxis	57
6.2.7. <i>In vitro</i> phagocytic activity of neutrophils	57
6.2.8. Leukocyte recruitment and nitric oxide levels determination in zymosan-induced peritonitis model	58
6.2.9. <i>In situ</i> intravital microscopy analysis for rolling and adhesion events of leukocytes in the microcirculation	58
6.2.10. Paw edema and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan	59

6.2.11. Acute oral toxicity study.....	59
6.2.12. Statistical analysis.....	60
6.3. Results.....	60
6.3.1. Analysis of ylang-ylang essential oil (YEO).....	60
6.3.2. YEO did not induce <i>in vitro</i> cytotoxicity.....	62
6.3.3. YEO reduces neutrophil chemotaxis <i>in vitro</i>	62
6.3.4. YEO reduces phagocytic activity of neutrophils.....	63
6.3.5. YEO reduces leukocytes recruitment and NO production in zymosan-induced peritonitis model.....	64
6.3.6. YEO treatment reduces leukocyte rolling and adhesion.....	65
6.3.7. YEO treatment reduces paw edema formation and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan.....	65
6.3.8. YEO treatment did not induce acute oral toxicity <i>in vivo</i>	67
6.4. Discussion.....	67
6.5. Conclusion.....	70
Data Availability.....	70
Conflict of interests.....	71
Acknowledgment.....	71
References.....	71
 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 77
 ANEXOS.....	 79

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas e os óleos essenciais são amplamente utilizadas há muitos anos para diversas finalidades, como preparação e preservação de alimentos, uso em rituais religiosos e produtos cosméticos, além de serem utilizados para fins medicinais, devido às suas atividades biológicas (GIANNENAS et al., 2020). As propriedades farmacológicas das plantas medicinais são atribuídas, em parte, aos óleos essenciais e seus constituintes (EDRIS, 2007). Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por diversas plantas aromáticas, sendo constituídos basicamente de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (AHMED et al., 2019; DHIFI et al., 2016). Esses óleos essenciais apresentam diversas atividades biológicas já descritas na literatura, tais como: antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antineoplásica, dentre outras (DHIFI et al., 2016).

A *Cananga odorata*, conhecida popularmente como ylang-ylang, é uma planta pertencente à família Annonaceae. Esta planta é de crescimento rápido e pode ser encontrada nativamente em países asiáticos, especialmente onde o clima tende a ser tropical úmido, como Filipinas, Malásia, Indonésia, Ilhas de Madagascar, entre outros. O óleo essencial de ylang-ylang (OEY) pode ser obtido das flores de desta planta e é amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, perfumes e aromaterapia (TAN et al., 2015). Alguns trabalhos demonstraram diversas propriedades farmacológicas de extratos de ylang-ylang e do OEY, tais como: antivirais (INDRASETIWAN et al., 2019), antimicrobiana (AHMAD; BEG, 2001; NGUYEN-POUPLIN et al., 2007), antioxidante (KUSUMA et al., 2014) e sedativa (PUJIARTI et al., 2012), dentre outras. Estudos com OEY demonstraram que os constituintes majoritários desse óleo são: benzoato de metila, geraniol, eugenol, linalol, acetato de benzila, pineno e cariofileno (TAN et al., 2015). No entanto, variações na composição dos óleos essenciais podem ocorrer dependendo da origem geográfica do material vegetal, condições de cultivo e variações sazonais (SHAHAZI, 2016).

A inflamação é uma resposta do sistema imune que pode ser desencadeada por vários fatores, tais como patógenos, dano tecidual e toxinas (CHEN et al., 2018). Essa resposta tem como objetivo principal remover os patógenos, visando promover o reparo e o reestabelecimento da homeostase tecidual (FERRERO-MILIANI et al., 2007). A resposta inflamatória é caracterizada por rubor, edema, calor, dor e perda da função do tecido, sinais

estes que resultam de eventos vasculares e ações coordenadas de células do sistema imune (CHEN et al., 2018; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Durante o processo inflamatório são observadas alterações importantes na microcirculação, como aumento da permeabilidade vascular, recrutamento e migração de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios (FERRERO-MILIANI et al., 2007; VAN LOON et al., 2020).

A migração celular é uma etapa crucial na resposta inflamatória e os neutrófilos são as primeiras células recrutadas na inflamação aguda (ROBB et al., 2016). A transmigração destas células para o sítio inflamatórios/infeccioso é essencial para a resolução da inflamação quando associada à infecção, onde a fagocitose é essencial para a função microbicida dos neutrófilos. No entanto, se essa etapa se torna excessiva, pode levar a prejuízos, como liberação excessiva de mediadores e danos teciduais no hospedeiro (SILVA, 2011).

Os fármacos anti-inflamatórios tradicionalmente utilizados na prática clínica, tais como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), provocam diversos efeitos adversos, como lesões gástricas, problemas cardiovasculares e renais, principalmente durante o uso crônico (BINDU et al., 2013). Portanto, a busca por produtos naturais com atividade anti-inflamatória que possuam maior potência e menor incidência de efeitos adversos é promissora.

Vários estudos foram realizados com extratos de *Cananga odorata* e alguns dos constituintes do OEY, demonstrando seus efeitos na resposta inflamatória (CHOI; HWANG, 2005; ESTEVÃO-SILVA et al., 2014; MANIYAR; CH, 2015; PEANA et al., 2002). No entanto, nenhum estudo avaliou especificamente os efeitos do OEY na ativação leucocitária e na resposta inflamatória aguda em modelos experimentais. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do OEY na atividade de leucócitos e parâmetros inflamatórios durante a resposta inflamatória aguda *in vitro* e *in vivo*.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Produtos Naturais e Plantas Medicinais

A utilização de produtos naturais, especificamente plantas com possíveis potenciais medicinais, sempre contribuiu de forma muito importante no tratamento de doenças ao redor do mundo. O uso dessas plantas medicinais acontece, principalmente, no tratamento alternativo de doenças, sendo um conhecimento etnofarmacológico passado por várias gerações pelas populações ao redor do mundo, constituindo uma prática milenar (AHMED; MURTAZA, 2015). Em certas localidades e povos, o único tratamento medicinal disponível se dá pelo o conhecimento sobre o potencial medicinal destas plantas (HAYTAA et al, 2014) e, segundo dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), os residentes de países em desenvolvimento dispõem do uso desta alternativa fitoterápica devido principalmente à dificuldade de acesso a medicamentos , tanto pela distância (zona rural e aldeias) dos grandes centro urbanos, como pelo custo elevado para a condição aquisitiva daquela população, tornando-se assim, sua única via de acesso a possíveis tratamentos de doenças (WHO, 2007).

O interesse pelo potencial farmacológico destas plantas vem crescendo novamente, devido ao fato de tais plantas apresentarem misturas complexas de compostos químicos, que podem ser os responsáveis pelas diferentes atividades farmacológicas descritas pela população que as utiliza. Muitas dessas atividades estão sendo avaliadas e confirmadas em diversos estudos, a validação destas atividades farmacológicas é de grande importância para o setor de desenvolvimento de novos medicamentos, quando se considera a utilização de substancias ativas nessas plantas como protótipos de fármacos e também servindo como matéria-prima para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial farmacológico (SIMÕES, et al., 2007). As plantas medicinais também são uma alternativa mais acessível e de menor custo em relação aos medicamentos sintéticos, na grande maioria dos casos (CALIXTO, 2000).

Em 2006, no Brasil, o Ministério da Saúde implementou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). O principal intuito foi garantir segurança e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos para a população, estabelecendo um controle de qualidade na venda e distribuição de tais produtos, além de vigilância com base

científica com testes toxicológicos dos materiais vegetais utilizados pela população. Além disso, essas políticas contribuíram e incentivaram o setor de desenvolvimento e as indústrias farmacêuticas a se adaptarem e focar na pesquisa e uso da biodiversidade (FIGUEIREDO et al, 2014).

Dentro deste contexto, de expressiva utilização de plantas medicinais, é importante ressaltar a necessidade de novos estudos que permitam validar suas ações e mecanismos farmacológicos por meio de estudos pré-clínicos que permitam a utilização destas plantas de forma eficaz e segura.

2.2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas constituídas por substâncias complexas e voláteis, tendo como característica principal um odor intenso, e são, na grande maioria, obtidos de plantas aromáticas (BAKKALI et al., 2008). Possuem características específicas como: composição líquida quando em temperatura ambiente, aspecto oleoso, incolor ou com leve tom amarelado e instabilidade quando expostos a calor, luz, etc (SIMÕES et al., 2016).

Os óleos essenciais podem ser obtidos de diferentes partes de uma planta, seja das raízes, flores, folhas, frutos, caule e até mesmo das sementes. Fatores de caráter ambiental, tais como: sazonalidade, variações climáticas, tipos de solos e idade da planta, por exemplo, podem exercer uma grande influência na composição, produção e concentração dos constituintes presentes nestes óleos. Para a determinação química dos compostos presentes nos óleos essenciais, são utilizadas técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa ou cromatografia líquida de alta eficiência, por exemplo (SIMÕES et al., 2016; GOBBONETO & LOPES, 2007).

Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos, sendo estas substâncias correspondentes à aproximadamente 90% de toda composição do óleo, isso incluindo monoterpenos e sesquiterpenos (BAKKALI et al., 2008). Os monoterpenos apresentam um amplo espectro de propriedades biológicas, como ação anti-inflamatória, analgésica, neuroprotetora, antioxidante e antitumoral (ARAÚJO-FILHO et al., 2016; PINA et al., 2017; SERAFINI et al., 2015). Apesar da grande presença de terpenos, os

óleos essenciais possuem a capacidade de apresentar uma diversidade estrutural destas moléculas, devido as variações causadas por fatores genéticos e sazonais. Entretanto, alguns óleos possuem compostos majoritários que podem atingir até 85% do total da composição total da substância (MIGUEL, 2010).

Os óleos essenciais apresentam uma grande importância no setor econômico devido à sua utilização crescente em diversos setores, como na indústria de alimentos (aromatizantes), cosméticos e na indústria farmacêutica. Na indústria farmacêutica, apesar de serem utilizados como excipientes, muitos óleos essenciais apresentam propriedades farmacológicas, como por exemplo, ação digestiva, cardiovascular, antisséptica, moduladora do sistema nervoso central (SNC), anestésica e anti-inflamatória (SIMÕES et al., 2016). Alguns estudos investigaram e comprovaram as atividades farmacológicas de vários óleos essenciais utilizados pela população, como atividades gastroprotetora, anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (LIJU et al., 2015; VIDAL et al., 2017; BAYALA et al., 2014; KHODABAKHSH et al., 2015).

2.3. Ylang-ylang (*Cananga odorata*)

A *Cananga odorata* Hook. F. & Thomson (Figura 1), conhecida popularmente como ylang-ylang, é uma planta de porte médio, pertencente à família Annonaceae, nativamente encontrada na Ásia tropical, como Filipinas, Malásia, Indonésia e algumas outras ilhas do Oceano Índico, principalmente as ilhas Comoro e Madagascar. O óleo essencial de Ylang-ylang (OEY) é amplamente utilizado na indústria de alimentos, bem como na indústria de perfumes e aromaterapia. Este óleo é obtido da flor da planta *C. odorata* por hidrodestilação, maceração, ou extração por solvente. O OEY teve sua segurança validada pela *Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA) para sua utilização como agente aromatizante e adjuvante.

Atualmente, o OEY pode ser encontrado em vários produtos, tais como: óleos de massagem, cremes hidratantes, perfumes e até velas perfumadas. Devido ao seu uso medicinal pela população local onde essa planta é encontrada, se torna um dos principais fatores que contribuem para o aumento da sua popularidade e utilização no campo da aromaterapia (TAN, L. T. H. et al., 2015).

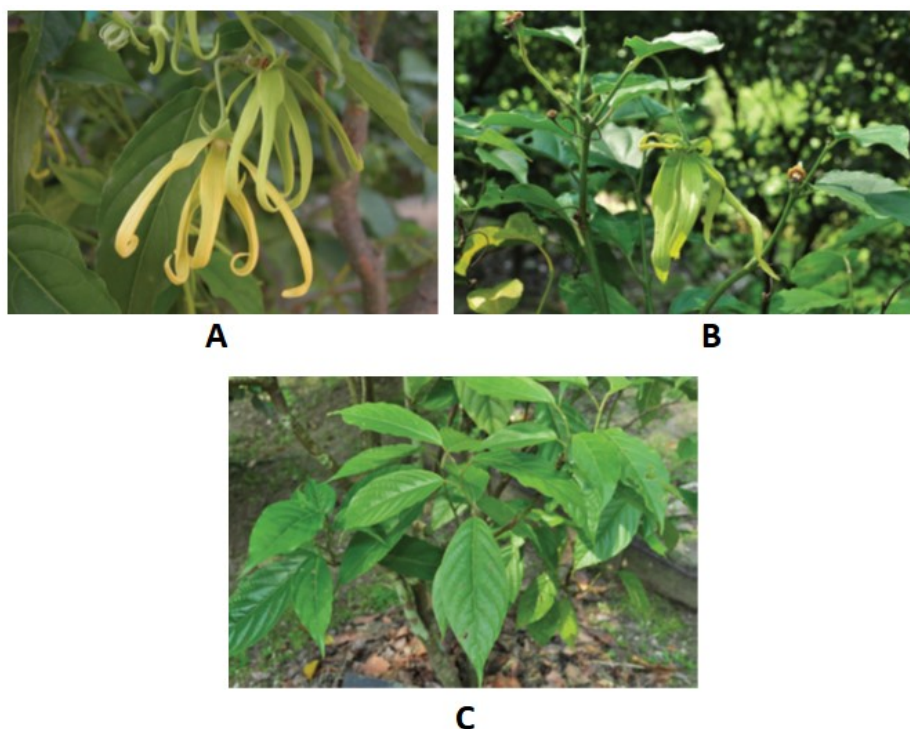


Figura 1. Morfologia da planta *C. odorata*. (A) Flor madura de *C. odorata* com pétalas amarelas, (B) flor jovem de *C. odorata* verde-amarelado, (C) folhas da planta *C. odorata*. (TAN et al, 2015).

A *C. odorata* possui uma variedade de usos na medicina tradicional. Devido ao forte perfume presente nas flores, as mesmas eram utilizadas para realçar o cheiro de outros óleos essenciais em massagens terapêuticas pelos polinésios que vivem nas ilhas do Pacífico Sul (HOLDSWORTH, 1990). Na ilha de Java e no Vietnã, as flores secas de *C. odorata* são usadas no tratamento da malária (NGUYEN-POUPLIN et al., 2007). Também foi relatado que a pasta de flores frescas é utilizada no tratamento de asma. Adicionalmente, as flores e a casca de *C. odorata* são usadas para tratar pneumonia e dores estomacais pela população local e por curandeiros das Ilhas Marianas do Norte (NANDWANI et al, 2008). Na Indonésia, o OEY é usado como terapia alternativa para o tratamento de depressão e ansiedade (S. HOLT, 1999). Na Índia, as folhas de *C. odorata* são utilizadas pela população local para o tratamento de dermatite, por aplicação tópica direta (JAIN & SRIVASTAVA, 2005) também se utiliza do OEY para tratar cefaleia, problemas inflamatórios oculares e gota (HOLDSWORTH, 1990).

Embora o uso do OEY e sua segurança como ingrediente alimentício e adjuvante cosmético seja comprovada, a avaliação sobre os efeitos farmacológicos continuaram escassos. Devido ao aumento do seu uso e grande escala de produção para uso industrial, torna-se interessante a realização de novos estudos que investiguem a atividade biológica

deste óleo essencial, com o intuito de validar melhor seu uso e desenvolver novos produtos com aplicações práticas.

2.4. Resposta Inflamatória e Mediadores Inflamatórios

O processo inflamatório é definido como uma resposta do organismo frente a uma lesão tecidual ou infecciosa no tecido saudável. O dano inicial ocasionado é denominado de lesão primária, levando a surgimento de processos como alteração no pH, desnaturação de macromoléculas e liberação de substâncias conhecidas como mediadores, os quais são responsáveis por provocar alterações bioquímicas a nível celular e vascular nos tecidos inflamados (DE SOUZA; SILVA, 2014; ROCHA et al., 2015).

A inflamação pode ser desencadeada por inúmeros estímulos, tais como: agentes biológicos (vírus, fungos e bactérias) substâncias químicas (formaldeídos), e agentes físicos (calor, frio, radiação, danos mecânicos). Além disto, muitas doenças possuem caráter inflamatório, entre elas podemos destacar a aterosclerose, doenças autoimunes, infecções no geral e o câncer (MUNN, 2016; NETEA et al., 2017). A inflamação é caracterizada por cinco sinais clínicos característicos, que são edema, o rubor, o calor, dor e em casos extremos onde o processo inflamatório adquire uma evolução sistêmica e crônica, o ultimo sinal se manifesta conhecido como perda da função do tecido. Estes sinais são provocados pela ação dos mediadores liberados nos tecidos locais como exemplo, a dor inflamatória que se dá pela diminuição no limiar excitatório dos neurotransmissores, levando a uma sensibilidade aos estímulos no local. (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

A inflamação pode ser dividida em dois tipos, a aguda e a crônica. A inflamação aguda se origina logo após a lesão tecidual, tendo como característica principal seu início rápido, onde ocorre um aumento do fluxo sanguíneo para o local lesionado e aumento da permeabilidade capilar, quimiotaxia e ocasionando a migração de leucócitos para o tecido, tendo como objetivo principal a remoção de possíveis invasores que ocasionaram o dano. (CIEMNIECK et al., 2016). Uma resposta inflamatória aguda tende a cessar no tempo correto após eliminar os agentes danosos e reparar o tecido lesionado, quando esse tempo se prolonga e não há término da sinalização das vias pró-inflamatórias e eliminação de células que trabalharam no foco inflamatório, a resposta se perpetua, tornando-se uma inflamação crônica. A falha no término do processo é visto sendo bem comum em casos de infecções

persistentes, exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, endógenos ou exógenos, doenças autoimunes, dentre outros (NETEA et al., 2017).

A inflamação aguda é comandada principalmente por mediadores liberados pelas células residentes (ex: mastócitos) incluindo os mediadores já pré-formados como: histamina, serotonina e heparina; e os mediadores pós formados: mediadores lipídicos, as citocinas e as espécies reativas de oxigênio (ERO's). Estes mediadores são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo para facilitar a migração dos leucócitos e o extravasamento de proteínas plasmáticas. Citocinas como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) desempenham um papel fundamental nesta fase (GABAY, 2006).

Por outro lado, a inflamação crônica trata-se de um processo prologando que sai da homeostase do corpo. As inflamações associadas a doenças autoimunes, alergias e infecções resistentes são um exemplo da cronificação do processo inflamatório. A inflamação crônica é capaz de durar meses ou anos e em alguns casos, persistir pelo resto da vida. Caracteriza-se pela presença de células mononucleares no tecido inflamado, remodelamento tecidual, angiogênese e fibrose. Tal processo é considerado um fator de risco principalmente para alguns tipos de neoplasias gastrointestinais, como esofágica, gástrica, hepática ou colorretal; isto devido aos mediadores liberados continuamente no processo, que acabam gerando um ambiente favorável à progressão tumoral (FERNANDES et al., 2015; WANG; DUBOIS, 2015).

Dando foco no processo inflamatório agudo, após a liberação de mediadores pré-formados pelas células residentes, ocorre a vasodilatação e o aumento da permeabilidade endotelial, o que permite a saída de um líquido rico em proteínas devido a uma mudança na pressão hidrostática. Esse fenômeno gera uma alta concentração de hemácias e permite que os leucócitos consigam migrar em direção a região periférica da corrente sanguínea, iniciando o processo de marginalização leucocitária, que é seguida pela diapedese e migração. Nesta etapa, as moléculas de adesão e as quimiocinas desempenham um papel crucial (FRANCISCHETTI et al., 2010).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN's), são as primeiras células a serem direcionados ao local de injúria tecidual, seguido pelos monócitos. As mudanças vasculares causadas pelos mediadores, permitem que os neutrófilos realizem ligações com as moléculas presentes nas células endoteliais, assim iniciando um processo denominado de "rolamento"

dos neutrófilos (Figura 2), a partir da ligação entre as L-selectinas presentes nos leucócitos com os receptores P-selectinas presentes no endotélio vascular, porém essa primeira ligação possui uma adesão fraca. Esse movimento dos leucócitos tem como objetivo permitir que estas células sejam capazes de interagir com fatores quimioatrativos liberados no local da injúria, o que inclui a ativação de plaquetas, IL-8, fator de complemento 5a (C5a), como também resultam na ativação e afinidade das integrinas, proteínas que levam a uma adesão forte que ocorre a partir da interação entre as integrinas leucocitárias e as imunoglobulinas endoteliais (SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008; SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

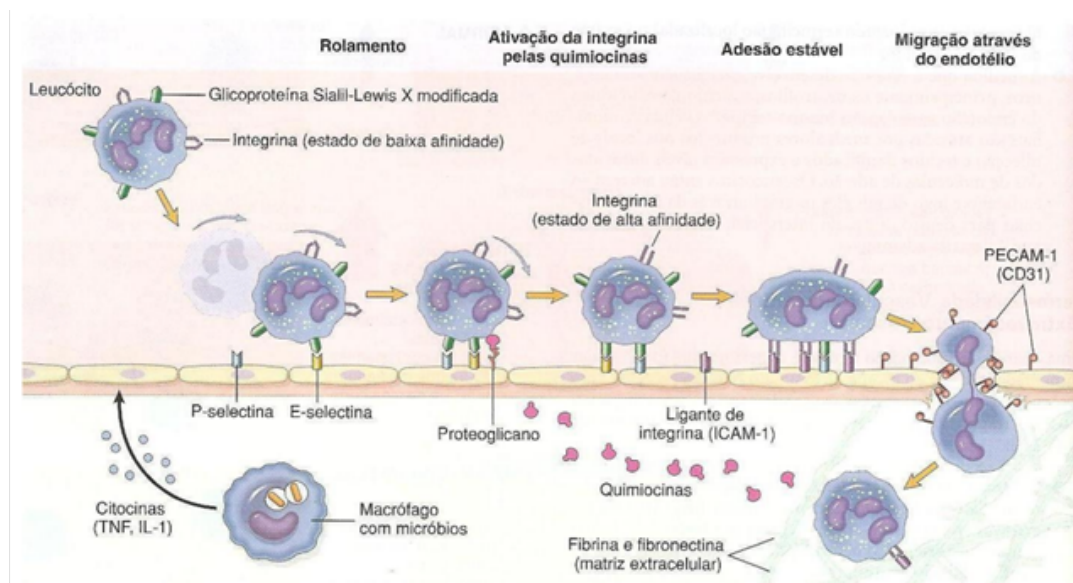


Figura 2. Mecanismo de migração de leucócitos através do endotélio vascular (ROBBINS et al, 2006).

Ainda no contexto dos mediadores pré-formados, os leucócitos ativados liberam enzimas lisossômicas que são capazes de causar possíveis lesões adicionais nos tecidos. Entretanto, a ativação destes leucócitos estimula vias bioquímicas envolvidas na produção de mediadores pós-formados tais como: as espécies reativas do oxigênio (ERO's), os mediadores lipídicos, além dos mediadores proteicos, tais como as citocinas, as quimiocinas e as moléculas de adesão (AMULIC et al., 2012).

Os mediadores lipídicos, conhecidos como eicosanoides, possuem um grande destaque no processo inflamatório. Dentre estes mediadores destacam-se as prostaglandinas (PG), especialmente a prostaglandina E2 (PGE2) que exerce várias funções inflamatórias e os leucotrienos (LT), especialmente o LTB4, que tem efeito quimiotático e os Cisteinil leucotrienos (LTC4, LTD4 e LTE4), que atuam como potentes broncoconstritores na asma. Para que ocorra uma resposta bem-sucedida, após a eliminação do agente causador é

necessário que se estabeleça a homeostase do tecido a partir do reparo tecidual e a resolução da inflamação. Este processo afim de cessar a inflamação se dá pela ação de mediadores lipídicos como as lipoxinas e as resolvinas, que são responsáveis por inibir o recrutamento de diversos leucócitos e estimular a liberação de macrófagos com perfil resolutivo, os quais são responsáveis pela remoção de células mortas e remodelamento tecidual (MEDZHITOV, 2010; SERHAN, 2007).

Na maioria dos casos de processo inflamatório, o retorno à homeostase é possível logo após a eliminação do agente causador da inflamação. No entanto, quando a resolução não é eficiente e o estímulo agressor persiste, a inflamação torna-se crônica e geralmente necessita de terapia farmacológica de longo prazo, o que pode levar a outras complicações como redução da eficácia da terapia e excesso de efeitos colaterais (ESTRADA RUIZ; MEDINA, 2011).

2.5. Fagocitose

Os fagócitos são células são capazes de englobar e digerir os patógenos através de um processo conhecido como fagocitose (Figura 3) (KOBAYASHI & DELEO, 2009). Os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas pertencem ao grupo de células conhecidas como “fagócitos profissionais” (SOEHNLEIN et al., 2010). Os neutrófilos, assim como os macrófagos, conseguem internalizar tanto partículas ligadas a anticorpos ou fragmentos do complemento (opsonizadas) quanto as não opsonizadas. No entanto, a opsonização tem o poder de facilitar todo o processo de fagocitose (PRUCHNIAK et al., 2013).

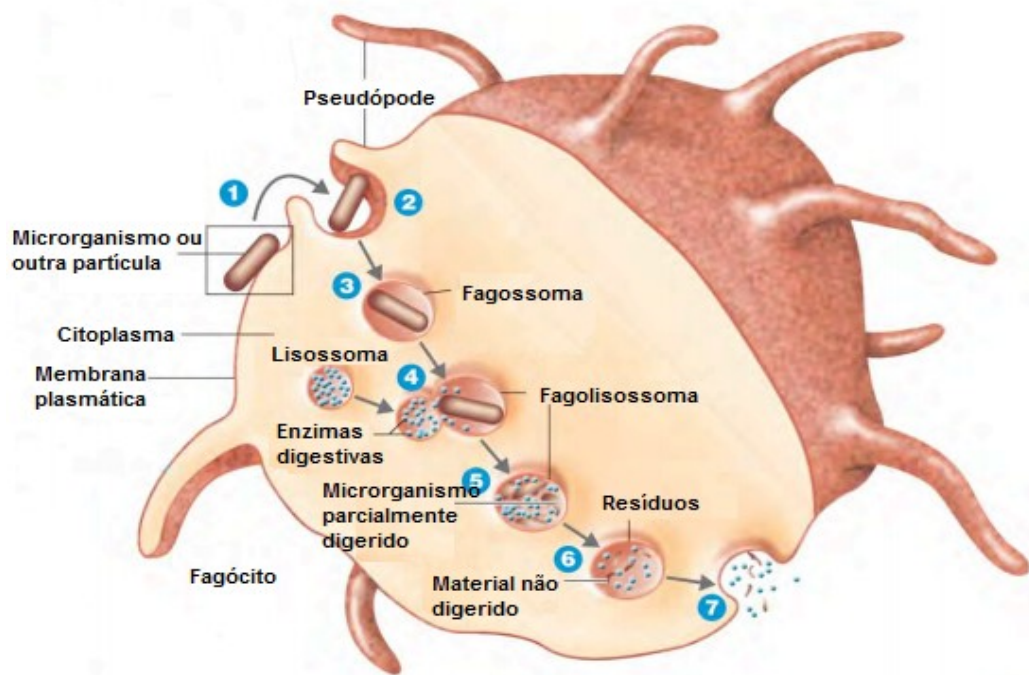


Figura 3. Etapas da fagocitose (adaptado de: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017)

Os neutrófilos, após sua ativação, expressam alguns receptores dependentes de opsoninas na sua membrana celular, o que possibilita o reconhecimento das partículas opsonizadas e consequentemente seu englobamento (KOBAYASHI; DELEO, 2009). Esse processo causa uma reorganização do citoesqueleto da célula, de forma que a membrana da célula consiga desenvolver pseudópodos que ajudam a ingestão de partículas opsonizadas, ativação do metabolismo oxidativo e desgranulação, sendo que essas reações atuam em conjunto na digestão do patógeno fagocitado (LUERMAN et al., 2010; FLANNAGAN et al., 2012). Os patógenos ou partículas estranhas ingeridas são englobadas por vacúolos ligados à membrana, conhecido como fagossoma, que se unem com vesículas lisossomais contendo grânulos citoplasmáticos, que correspondem a enzimas capazes de degradar as partículas, formando o fagolisossomo, num processo denominado maturação fagossomal. Dentro do fagolisossomo ocorre a liberação dos grânulos, que possuem enzimas líticas e EROs, destruindo os microrganismos ou partículas fagocitadas; (MAYADAS et al., 2014).

Os neutrófilos englobam e destroem agentes patogênicos de forma rápida, o que pode ser considerado uma vantagem em termos de defesa do hospedeiro. Porém, durante a fagocitose e a maturação, pode acontecer dos grânulos se unirem com o fagossoma antes de sua selagem completa, causando uma liberação de substâncias líticas e produtos oxidativos

fora dos neutrófilos, consequentemente, lesando as demais células ao redor (MAYADAS et al., 2014). Após todo o processo de fagocitose, os neutrófilos que se encontram ativados no processo, entram em processo de apoptose e são fagocitados pelos macrófagos, sendo este um processo essencial para a resolução da resposta inflamatória (GALLEY et al., 2008).

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O uso de fármacos anti-inflamatórios se torna limitado na terapêutica devido aos efeitos adversos que podem ocasionar. Sendo assim, a busca de produtos naturais com atividade anti-inflamatória com maior potência e menor incidência de reações adversas se torna relevante. Esta pesquisa contribui para a validação de alternativas terapêuticas para o tratamento de condições inflamatórias, já que os estudos que mostram o efeito do OEY e seus principais constituintes sobre resposta inflamatória aguda são insuficientes.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

O objetivo geral desse trabalho foi analisar e identificar os principais constituintes do OEY, avaliar a toxicidade aguda e os efeitos deste óleo essencial sobre o comportamento de leucócitos e parâmetros inflamatórios na resposta inflamatória aguda em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

4.2. Objetivos específicos

Especificamente foram analisadas as ações do OEY sobre:

- a citotoxicidade *in vitro*;
- a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* estimulada por fMLP;
- a atividade fagocitária de neutrófilos *in vitro*;
- o recrutamento de leucócitos induzida por zymosan em camundongos no modelo de peritonite;
- a produção e liberação de NO em modelo de peritonite;
- a microcirculação *in situ* em ratos;
- a formação de edema e hiperalgisia induzidas por carragenina.
- a toxicidade oral aguda;

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 113-123, fev. 2001.
- AHMED, A. F. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 3, p. 299-305, set. 2019.
- AHMED, M. J.; MURTAZA, G. A study of medicinal plants used as ethnoveterinary: Harnessing potential phytotherapy in Bheri, District Muzaffarabad (Pakistan). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 209-214, 2015.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **annual review of immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.
- Antiinflammatory activity of phenolic compounds from the whole plant of *Scutellaria indica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 5, p. 1129-1134, 2015.
- ARAÚJO-FILHO, H. G. et al. Neuroprotective effect of natural products on peripheral nerve degeneration: a systematic review. **Neurochemical research**, v. 41, n. 4, p. 647-658, 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BAYALA, B. et al. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92122, 2014.
- BINDU, S. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- κ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 456-467, dez. 2013.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2018.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW264.7 cells and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 76, n. 2, p. 194-203, 2005.

CIEMNIECKI, J. A.; LEWIS, C. P.; GUPTON, J. T.; STENGER, K. F. Effects of a Pyrrole based, microtubule depolymerizing compound on RAW 264.7 macrophages. **Chemico Biological Interactions**, v. 246, p. 63-68, 2016.

DE SOUZA, F. C. B.; DA SILVA, M. Z. M. Controle do processo inflamatório na odontologia com antiinflamatorios não-esteroidais. **revista uningá review**, v. 20, n. 2, 2018.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 1-16, 2016.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 4, p. 308-23, 2007.

ESTEVAO-SILVA, C. F. et al. Anethole and eugenol reduce *in vitro* and *in vivo* leukocyte migration induced by fMLP, LTB₄, and carrageenan. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, n. 3, p. 567-575, 2014.

ESTRADA, H. A. G.; RUIZ, K. N. G.; MEDINA, J. D. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 3, 2011

FERNANDES, J. V. et al. The role of the mediators of inflammation in cancer development. **Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 3, p. 527-534, 2015.

FERRERO-MILIANI, L. et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clinical and experimental immunology**, v. 147, n. 2, p. 227-235, 2007.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FLANNAGAN R. S.; JAUMOUILLE V.; GRINSTEIN S. The cell biology of phagocytosis. In: ABBAS A. K.; GALLI S. J; HOWLEY P. M. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7. p. 61-98, 2012.

FRANCISCHETTI, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular/Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 25, n. 4, p. 575- 584, 2010.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** 2000, v. 63, n. 1, p. 149- 164, 2013.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis research & therapy**, v. 8, n. 2, p. 1, 2006.

GALLEY, H. F.; EL SAKKA, N. E.; WEBSTER, N. R.; LOWES, D. A.; CUTHBERTSON, B. H. Activated protein C inhibits chemotaxis and interleukin-6 by human neutrophil without affecting other neutrophils functions. **British Journal of Anaesthesia**, v. 100, n. 6, p. 815-819, 2008.

GIANNENAS, I. et al. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives. In: **Feed Additives**. Ed. Elsevier, p. 1-18, 2020.

GOBBO-NETO, L.; NORBERTO P. L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HAYTAA, S.; POLATB, R.; SELVIC, S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 613–623, 2014.

HOLT, S. Part 2: Stimulants and Sietary Supplements. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 5, n. 5, p. 279-285, 1999.

HUSAIN, A.; AHMAD, A.; KHAN, S.A.; ASIF, M.; BHUTANI, R.; AL-ABBASI, F.A. INDRASETIAWAN, P. et al. Antiviral Activity of *Cananga odorata* Against Hepatitis B

Virus. **The Kobe journal of medical sciences**, v. 65, n. 2, p. 71-79, 2019.

KHODABAKHSH, P.; SHAFAROODI, H.; ASGARPANA, J. Analgesic and antiinflammatory activities of *Citrus aurantium* L. blossoms essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. **Journal of natural medicines**, v. 69, n. 3, p. 324-331, 2015.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.

KUSUMA, I. W. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 4, p. 191-196, 2014.

LIJU, V. B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Gastroprotective activity of essential oils from turmeric and ginger. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 95-103, 2015.

LUERMAN, G. C.; URIARTE, S. M.; RANE, M. J.; MCLEISH, K. R. Application of proteomics to neutrophil biology. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 552-561, 2010.

MANIYAR, D.; CH, D. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Cananga odorata* Lam. in experimental animals. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 354-357, 2015.

MARQUES-ROCHA, J. L. et al. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 9, p. 3595-3611, 2015.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010.

MUNN, L. L. Cancer and inflammation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 9, n. 2, p. e1370, 2017.

NANDWANI, D.; CALVO, J. A.; TENORIO, J.; CALVO F.; MANGLONA, L. Medicinal plants and traditional knowledge in the northern Mariana Islands. **Journal of Applied Biosciences**, vol. 8, no. 2, pp. 323-330, 2008.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826-831, 2017.

NGUYEN-POUPLIN, J. et al. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 417-427, fev. 2007.

OH, Y.C.; JEONG, Y.H.; CHO, W.K.; HA, J.H.; GU, M.J.; MA, J.Y. Anti-inflammatory and analgesic effects of Pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xylene-induced ear edema. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1232-1251, 2015

PEANA, A. T. et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 721-726, jan. 2002.

PINA, L., GOUVEIA, D. N., COSTA, J. S., QUINTANS, J., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., BARRETO, R., & GUIMARÃES, A. G. New perspectives for chronic pain treatment: a patent review (2010-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 7, p. 1-10, 2017.

PUJIARTI, R. et al. Effect of *Melaleuca leucadendron*, *Cananga odorata* and *Pogostemon cablin* oil odors on human physiological responses. **Wood Research**, v. 3, n. 2, p. 100-105, 2012.

ROBB, C. T. et al. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. **Seminars in immunopathology**, v. 38, n. 4, p. 425-428, 2016.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature immunology**, v. 9, n. 9, p. 949, 2008.

SERAFINI, M. R. et al. Natural compounds for solar photoprotection: A patent review. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n 4, p. 467–478, 2015.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 200-215, 2015.

SHAHBAZI, Y. Variation in Chemical Composition of Essential Oil of *Ferulago angulata* Collected from West Parts of Iran. **Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 16-21, 2016.

SILVA, M. T. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 89, n. 5, p. 675-683, 2011.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectiva de tratamento. **Jornal vascular brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 367-378, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 6ª ed., Editora UFSC, UFRGS Editora, cap. 25, 2007.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SOEHNLEIN O.; LINDBOM L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427-439, 2010.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TAN, L. T. H. et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-30, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed,

2017. Cap 17. p.451

VAN LOON, L. M. et al. Effect of Vasopressors on the Macro- and Microcirculation During Systemic Inflammation in Humans *In Vivo*. **Shock**, v. 53, n. 2, p. 171-174, 2020.

VIDAL, C. S. et al. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 47-55, 2017.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 10, p. 1085- 1093, 2015.

WHO. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. **World Health Organization**, p. 118, 2007.

**ARTIGO: EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE YLANG-
YLANG (*Cananga odorata*) SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA *IN VITRO* E *IN VIVO***

6. ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of Ylang-ylang (*Cananga odorata*) essential oil on the acute inflammatory response *in vitro* and *in vivo*

Robson Araujo de Freitas Junior¹, Saulo Euclides Silva-Filho^{1*}

¹Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition College, Federal University of Mato Grosso do Sul,
Campo Grande, MS, Brazil

*Correspondence should be addressed to Saulo Euclides Silva-Filho; saulo.e@ufms.br

Abstract

Ylang-ylang (*Cananga odorata*) is a medicinal plant of the Annonaceae family, with many therapeutic properties and biological activities, such as anxiolytic, antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activities, among others. The aim of this study was to evaluate the chemical composition, oral acute toxicity, and the effect of ylang-ylang essential oil (YEO) on the acute inflammatory response in experimental models. YEO was analyzed by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. For *in vitro* tests, YEO was evaluated in methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) test, neutrophil chemotaxis induced by *N*-formyl methionyl leucyl phenylalanine (fMLP), and phagocytic activity tests. The YEO was orally administered in zymosan-induced peritonitis, carrageenan-induced leukocyte rolling and adhesion events in the *in situ* microcirculation model, and carrageenan-induced paw oedema models. The YEO (2000 mg/kg) was also tested in acute toxicity test in *Swiss* mice. YEO showed predominance of benzyl acetate, linalool, benzyl benzoate, and methyl benzoate. YEO did not present *in vitro* cytotoxicity. YEO at concentrations of 10, 30, 60 and 90 µg/mL reduced the *in vitro* neutrophil chemotaxis induced by fMLP, and at concentrations of 10, 30, and 90 µg/mL, reduced the phagocytic activity. The oral treatment with YEO at doses of 100 and 200 mg/kg reduced the leukocyte recruitment, nitric oxide (NO) production in zymosan-induced peritonitis model, reduced rolling and adherent leukocyte number induced by carrageenan in the *in situ* microcirculation, and reduced carrageenan-induced edema and mechanical hyperalgesia. YEO did not present signs of toxicity in acute toxicity test. In conclusion, YEO affected the leukocyte activation, presented antiedematogenic, anti-hyperalgesic and anti-inflammatory properties in experimental models. The mechanism of YEO may be involved the NO participation, however the other inflammatory pathways should not be discarded.

Keywords: yland-ylang, acute inflammation, anti-inflammatory, natural products.

6.1. Introduction

Aromatic plants and essential oils are widely used for various purposes, such as food preparation and preservation, cosmetic products, in addition to being used for medicinal purposes since they have relevant biological activities [1]. The pharmacological properties of medicinal plants are attributed, partially, to the presence of essential oils and their compounds [2]. Essential oils are secondary metabolites produced by various aromatic plants, consisting basically of monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids [3, 4]. Essential oils exhibit antibacterial, anti-oxidative, anti-inflammatory, cancer chemoprotective activities, among others [3].

Ylang-ylang (*Cananga odorata*) is a medicinal plant of the Annonaceae family and can be found natively in Asian countries, and also in countries such as the Philippines, Malaysia, Indonesia, Madagascar among others. Ylang-ylang essential oil (YEO) can be obtained from *C. odorata* flowers and it is widely used in food, perfume and aromatherapy industries [5]. Ylang-ylang extracts and YEO have demonstrated antiviral [6], antimicrobial [7, 8], antioxidant [9], sedative activities [10], among others. Studies of YEO composition showed the presence of methyl benzoate, geraniol, eugenol, linalool, benzyl acetate, pinene, and caryophyllene [5]. However geographical origin, climate and seasonal variations where the plant is obtained, could influence the essential oils composition [11].

Inflammation is an immune system response that can be triggered by several factors, such as pathogens, tissue damage and toxins [12]. This response acts by removing pathogens, promoting repair and tissue homeostasis [13]. The inflammatory response is characterized by redness, swelling, heat, pain, and loss of tissue function, which result from vascular events, and immune cell actions [12, 14]. During the inflammatory process, important changes in microcirculation are observed, such as vascular permeability increase, leukocytes recruitment and migration, and release of inflammatory mediators [13, 15].

Cell migration is a crucial step in inflammatory response, and neutrophils are the first cells attracted in acute inflammation [16]. The migration of these cells to the inflammatory/infectious sites is essential to the resolution of inflammation when associated to infection, in which phagocytosis is essential for microbicidal function of neutrophils. However, excessive migration of these cells can damage host cells and tissues [17].

The nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used in clinical practice and promote various adverse effects, such as gastric damage, cardiovascular and kidney lesions,

especially during chronic use [18]. Therefore, the search for natural products with anti-inflammatory activity and less adverse effects is relevant.

Several researches have been performed with extracts of *C. odorata*, and some constituents of YEO, demonstrated their effect on the inflammatory response [19–22]. However, no studies have specifically evaluated the effects of YEO on leukocyte activation and inflammatory response in experimental models. Thus, in this study, we aimed to evaluate the YEO effect on leukocyte behavior and inflammatory parameters during acute inflammatory response. The chemical composition and the acute oral toxicity of YEO were also investigated.

6.2. Material and methods

6.2.1. Chemicals and drugs

YEO, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (MTT), zymosan, *N*-formyl methionyl leucyl phenylalanine (fMLP), indomethacin and carrageenan were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All other chemicals used were analytical grade.

6.2.2. Analysis of the essential oil and compound identification

The YEO was chemically analyzed by Gas chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) using a gas chromatography Shimadzu QP2010 couple to mass spectrometer with electron ionization (EI) source, which was applied an ionization energy of 70 eV. The chromatographic column was a Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 mm in thickness) using as carrier gas (pressure 79.7 kPa and column flow rate 1.30 mL/min). The split ratio was 1:40 and the temperature programming was 60 to 220°C and it was increasing by 3°C/min. WILEY 7, NIST 11 and FFNSC data banks were used to identify the constituents and their retention index (calculated by the injection of a series of alkanes C9 to C22) were compared with the reported by Adams (1995).

6.2.3. Animals

Male and female *Swiss* mice (weighing 20–30 g) were provided by the Central Animal House of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), and Male *Wistar* rats (180–220 g) were provided by the Central Animal House of the State University of Maringá (UEM). The animals were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12/12 h light/dark cycle. Prior to the experiments, the animals were fasted overnight, with water provided *ad libitum*. The experimental protocols were approved by the Ethical Committee in Animal Experimentation of the UFMS (protocol number: 1.101/2019), and the Ethical Committee in Animal Experimentation of the UEM (protocol number: 9680050221).

6.2.4. Leukocytes preparation for in vitro assays

For conducting *in vitro* tests, leukocytes were obtained from male *Swiss* mice peritoneal cavity 4 hours after zymosan injection (1 mg/cavity, i.p.). The cells were collected after washing of the peritoneal cavity with 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) solution containing EDTA. The obtained cells were centrifuged (1000 rpm/10 min/ 4°C), the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in RPMI1640 medium containing 0.1% of bovine serum albumin (BSA). The viability of the leukocytes was detected by the trypan blue method, and in all tests carried out, the viability of the leukocytes was above 98%. Additionally, a differential cell count was performed and 95% of the leukocytes obtained corresponding to neutrophils.

6.2.5. Cell viability analysis (MTT assay)

The cell viability assay was performed as previously described [23]. The MTT assay is based on the mitochondrial enzyme reduction of the tetrazolium dye to detect and determine cell viability. The leukocytes were plated at 5×10^5 cells/well in 100 μL RPMI medium (with 10% of fetal bovine serum + 100 U/mL penicillin + 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin). After 90 minutes of exposure to YEO (3, 10, 30 or 90 $\mu\text{g/mL}$) or vehicle, 10 μL of MTT (5 mg/mL) was added to each well and then incubated at 37°C and with 5% of CO_2 for 2 hours. Subsequently, the supernatant was removed and 100 μL of DMSO was added to each well and cells were again incubated at 25°C with 5% of CO_2 for 10 min. Absorbance was measured at 540 nm. Viability was determined by the formula: Viability cells (%) =

(absorbance of treated cells – blank absorbance) / (control absorbance – blank absorbance) x 100. Data were presented as values of three independent experiments performed in triplicate.

6.2.6. In vitro *neutrophils chemotaxis*

The neutrophils chemotaxis assay was performed as previously described [24]. The neutrophils number (obtained from peritoneal lavage) was adjusted to 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium that containing 0.1% of bovine serum albumin (BSA). A chemotaxis assay was performed using a 48-well microchemotaxis plate (Neuro Probe), in which the chambers were separated by a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane (5 μ m pore size). The chemoattractant, *N*-formyl methionyl leucyl phenylalanine (fMLP 10^{-6} M), and vehicle (RPMI1640) were placed in the lower chamber. A neutrophil suspension (1×10^6 cells/mL) was pretreated for 30 min with YEO (1, 3, 10, 30, 60, or 90 μ g/mL) and then placed in the upper chamber. The chambers were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 60 minutes. Following incubation, the membrane was washed with PBS, fixed in methanol, and stained with Instant Prov kit. The membrane area of each well was scored using light microscopy to count the cells present in five random fields. The results are expressed as the mean number of neutrophils per field and are representative of triplicate measurements from three separate experiments.

6.2.7. In vitro *phagocytic activity of neutrophils*

The phagocytic activity of neutrophils assay was performed as previously described [25]. The cell suspension (2×10^6 cells/mL) (obtained from peritoneal lavage) was incubated for 30 minutes with different concentrations of YEO (10, 30, or 90 μ g/mL) or vehicle. For inducing phagocytosis, the neutrophil opsonization was performed with the incubation of the RPMI medium containing plasma from mice (10%) adding 10 μ L of a zymosan solution (5mg/mL) for 30 minutes. After the treatment period, cells were centrifuged and resuspended in 1 mL of RPMI medium containing 10% of plasma from mice and 10 μ L of a zymosan solution (5mg/ml) for 30 minutes at 37°C in 5% CO₂. Subsequently, cells were fixed and stained by the May-Grunwald-Giemsa. The count was held in an optical microscope and the results were expressed as number of neutrophils in phagocytosis by 100 neutrophils.

6.2.8. *Leukocyte recruitment and nitric oxide levels determination in zymosan-induced peritonitis model*

Male Swiss mice were pretreated with YEO (50, 100 or 200 mg/kg, p.o.) or with saline (0.9%) solution containing 1 % of tween 80 (vehicle - control group) ($n = 5-7$ animals/group). Thirty minutes later, all animals received an intraperitoneal zymosan injection (1 mg/cavity) or an equivalent volume of saline 0.9% solution. Six hours later, the animals were euthanatized and the cells were collected after washing of the peritoneal cavity with 1 mL of PBS solution containing EDTA. Counts were then performed in total and differential cells. The results are expressed as the number of leukocytes per cavity. The level of nitric oxide (NO) production was determined in peritoneal exudate by measuring the nitrite level in the culture medium by Griess reaction. The samples of peritoneal exudate were centrifuged at 1000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was separated (50 mL) and incubated with equal volumes of Griess reagent mixtures (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0,1% *N*-1- naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) at room temperature for 10 min. The absorbance was measured in a microplate reader at 550 nm. NO concentrations were calculated from a sodium nitrite standard curve. Data were presented as the mm concentration of NO^{2-} .

6.2.9. *In situ intravital microscopy analysis for rolling and adhesion events of leukocytes in the microcirculation*

YEO effect in the microcirculation was evaluated according previously described [26]. Rolling and adhesion of leukocytes to the endothelium were evaluated in male rat internal spermatic fascia 2 hours after carrageenan injection (100 µg) in the wall of scrotal chamber. YEO (50, 100, or 200 mg/kg), indomethacin (5 mg/kg, reference drug), or with saline (0.9 %) solution containing 1 % of tween 80 (vehicle – control group) was administered orally 30 min before carrageenan injection to different groups of male *Wistar* rats ($n = 5-7$ animals/ group). Animals anesthetized were maintained on a special board thermostatically controlled at 37 °C with a transparent platform for transillumination of the tissue on which the spermatic fascia was exposed and fixed for analysis by microscopy *in situ*. The preparation was kept moist and warm with Ringer-Locke's solution (pH 7.2–7.4) containing 1% gelatin. The vessels selected for the study were postcapillary venules with a diameter of 15–25 µm. The number of rolling and adherent leukocytes was determined at 10 minutes intervals. The

leukocytes were considered to adhere to the venular endothelium if they remained stationary for more than 30 seconds.

6.2.10. Paw edema and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan

One day before the experiment, the basal mechanical threshold was determined (mechanical sensitivity) using a digital mechanical analgesimeter (Von Frey, Insight®). Male Swiss mice were orally treated YEO at doses of 50, 100, and 200 mg/kg, indomethacin (5 mg/kg), or with saline (0.9 %) solution containing 1 % of tween 80 (vehicle – control group) ($n = 5-7$ animals/ group), 1 hour before paw edema induction with intraplantar injection of 100 μ l of the carrageenan solution (300 μ g/paw). Carrageenan was injected in the right hind paw of all animals, and saline solution 0.9% was injected into the contralateral paw at the same volume and considered as time zero. The edema was evaluated at 0.5, 1, 2 and 4 hours, while mechanical hyperalgesia was evaluated at 3 and 4 hours after carrageenan treatment. The paw edema evaluation was made using a plethysmometer (Insight®) [27]. The evaluation of mechanical hyperalgesia was performed after the animals were placed in a containment box with support for the analgesimeter test. The animals were allocated for 30 minutes to adapt to decrease exploratory behavior and support the four paws on the base. To measure the nociceptive mechanical sensitivity threshold (g) of the paw that received the carrageenan treatment, a digital analgesimeter (Von Frey, Insight®) [28] was used as a pressure transducer, which records the applied force (in grams) until the moment of paw withdrawal.

6.2.11. Acute oral toxicity study

The acute oral toxicity test was performed with male and female *Swiss* mice according to OECD 425 - 407 guidelines. The YEO (2000 mg/kg) or with saline (0.9 %) solution containing 1 % of tween 80 (vehicle) were administered by gavage, in a single dose, in 5 male animals and 5 female animals, fasting for 12 h. All animals remained under observation for 14 days [29–31]. The five Hippocratic parameters were observed daily: consciousness, motor coordination, reflexes (auditory and corneal), central nervous system (ataxia, tremors, sedation, seizure) and autonomic (piloerection, sialorrhea, cyanosis, ptosis and tearing) [32], as well as body weight, water and food consumption. The animals were euthanized by ketamine and xylazine overdose. Organs such as heart, spleen, lungs, liver and kidneys were removed, macroscopically observed and weighed [33].

6.2.12. Statistical analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ SEM for each experimental group. The results were statistically analyzed by using one-way variance analysis (ANOVA), followed by the Newman-Keuls post hoc test. The percentage of inhibition was calculated in relation to control group. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

6.3. Results

6.3.1. Analysis of YEO

The chemical composition of YEO was investigated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). The results of the GC-MS analysis (Figure 1) showed a predominance of benzyl acetate (18.21%), linalool (15.23%), benzyl benzoate (11.39%), and methyl benzoate (7.64%).

A complete list of the components and their relative quantity is presented in Table 1.

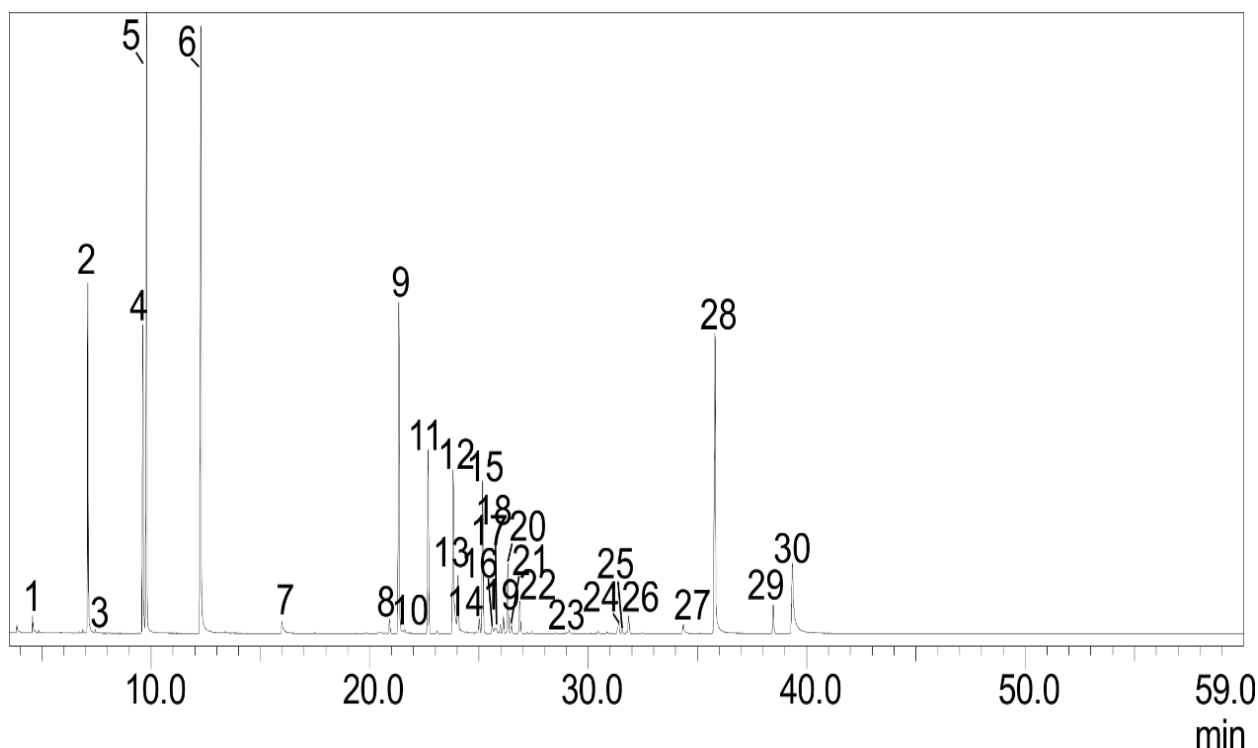


FIGURE 1: GC chromatogram of the *Cananga odorata* essential oil. The numbers on the peaks are attributed to majority compounds: 6. Benzyl acetate; 5. linalool; 28. benzyl benzoate; 4. methyl benzoate.

TABLE 1: Chemical composition of *Cananga odorata* essential oil

Peak	RT (min)	Compound	RI	%
1	4.57	Prenyl acetate	921	0.41
2	7.10	<i>p</i> -methyl anisole	1019	7.38
3	7.45	1,8-Cineole	1030	0.05
4	9.62	Methyl benzoate	1096	7.64
5	9.79	Linalool	1100	15.23
6	12.28	Benzyl acetate	1164	18.12
7	15.99	Linalyl acetate	1255	0.21
8	20.91	α -Copaene	1374	0.38
9	21.33	Geranyl acetate	1384	9.46
10	21.60	β -Elemene	1390	0.09
11	22.68	<i>trans</i> -caryophyllene	1417	5.42
12	23.82	Cinnamyl acetate	1445	6.05
13	24.05	α -Humulene	1451	1.80
14	25.01	γ -Muurolene	1475	0.42
15	25.17	Germacrene D	1479	4.61
16	25.60	Prenyl benzoate	1489	0.17
17	25.79	Bicyclogermacrene	1494	0.13
18	25.98	α -Muurolene	1499	0.21
19	26.12	γ -Bisabolene	1502	0.59
20	26.32	α -Farnesene	1508	2.02
21	26.49	γ -Cadinene	1512	0.22
22	26.87	δ -Cadinene	1522	0.98
23	29.12	Caryophyllene oxide	1580	0.06
24	31.40	α -Cadinol	1641	0.44
25	31.56	α -Muurolol	1645	0.10
26	31.86	Cadin-4-en-10-ol	1654	0.51
27	34.36	(<i>Z,Z</i>)-Farnesol	1722	0.38
28	35.80	Benzyl benzoate	1764	11.39
29	38.47	Farnesyl acetate	1841	0.83
30	39.34	Benzyl salicylate	1868	4.47

RT: retention time; RI: retention index on Rtx-5MS.

6.3.2. YEO did not induce *in vitro* cytotoxicity

In the cell viability assay, YEO was tested at different concentrations. YEO at concentrations of 3, 10, 30, and 90 $\mu\text{g/mL}$ presented cell viability of 98, 97, 89, and 91%, respectively, indicating that YEO did not induce cytotoxicity in any tested concentrations.

6.3.3. YEO reduces neutrophil chemotaxis *in vitro*

To investigate the direct effect of YEO on leukocyte chemotaxis, different concentrations of YEO were tested (1, 3, 10, 30, 60, and 90 $\mu\text{g/mL}$) in the *in vitro* chemotaxis assay. fMLP induced considerably neutrophil migration (42.8 ± 1.32 cells/field), compared to neutrophils exposed to RPMI-1640 medium (15.03 ± 1.2 cells/field). YEO significantly reduced neutrophil migration toward fMLP (10^{-6} M) at 10, 30, 60, and 90 $\mu\text{g/mL}$ concentrations (28.6, 44.6, 44.7, and 48.3%, respectively), compared to control group (Figure 2).

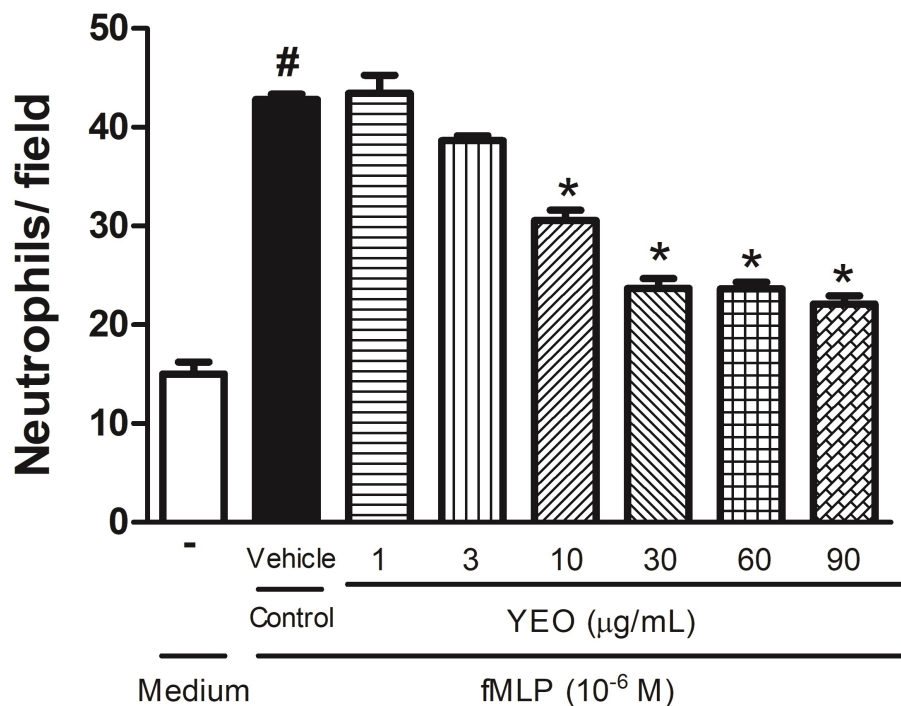


FIGURE 2: Effect of YEO on *in vitro* neutrophils chemotaxis. Neutrophils were obtained from the peritoneal cavity of mice, and stimulated with fMLP (10^{-6} M) 30 minutes after YEO treatments at concentrations of 1, 3, 10, 30, 60 and 90 $\mu\text{g/mL}$. Values are mean $\pm$ S.E.M. and are representative of three independent experiments. # $P < 0.05$ compared to Medium, * $P < 0.05$ compared to control group (ANOVA, Newman-Keuls's test).

6.3.4. YEO reduces phagocytic activity of neutrophils

The effect of YEO on phagocytic activity of neutrophils is demonstrated in Fig. 3. Our results showed that YEO treatment at concentrations of 10, 30, and 90 $\mu\text{g/ml}$ significantly reduced phagocytosis of zymosan particles by neutrophils in 66.4, 68.7, and 54.9%, respectively, compared to control group (Figure 3).

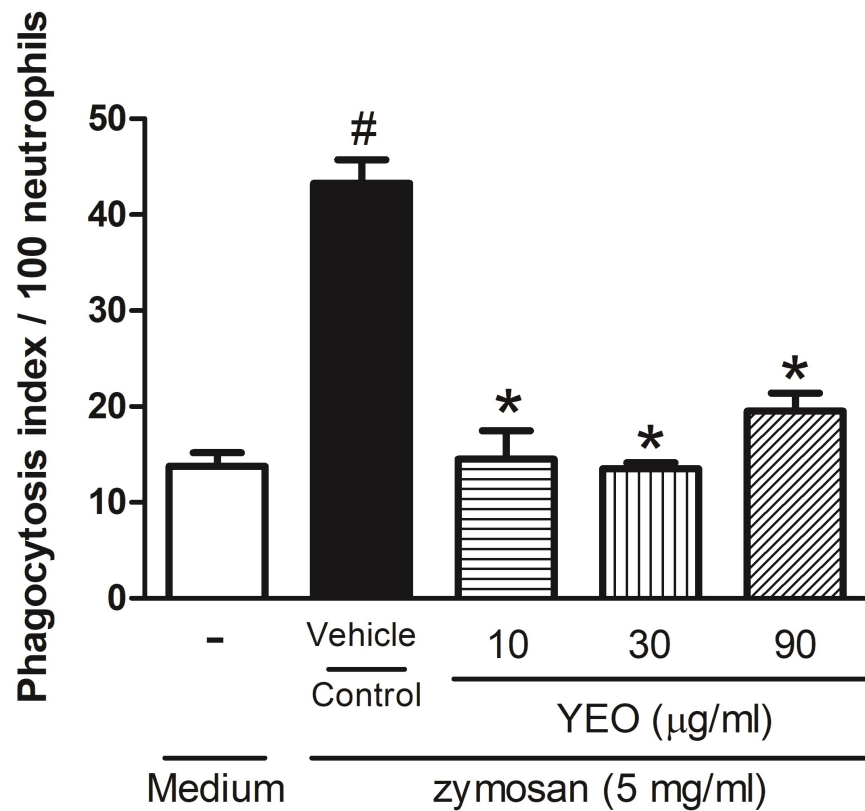


FIGURE 3: Effect of YEO on phagocytic activity of neutrophils. Neutrophils were obtained from the peritoneal cavity of mice, and treated with different concentrations of YEO (10, 30, and 90 $\mu\text{g/ml}$). Results are representative of three independent experiments. $^{\#}P < 0.05$ compared to Medium, $^*P < 0.05$, compared to the control group (ANOVA, Newman-Keuls's test).

6.3.5. YEO reduces leukocytes recruitment and NO production in zymosan-induced peritonitis model

Six hours after of zymosan-induced peritonitis, an inflammatory response evidenced and characterized by an increase in the number of leukocytes at peritoneal cavity ($12.45 \pm 2.02 \times 10^6$ cells/cavity) compared with the control group (saline) ($2.08 \pm 0.48 \times 10^6$ cells/cavity). Pretreatment of animals with YEO at doses of 100 and 200 mg/kg significantly reduced the leukocyte recruitment (27.88, and 32.37%, respectively) compared with the control group (Figure 4(a)). The decrease in the number of leukocytes was mainly attributable to a reduction of the number of polymorphonuclear (PMN) leukocytes (Figure 4(b)). The nitrite levels were used as parameters to evaluate the NO production in peritoneal exudate after zymosan-induced peritonitis in mice. Zymosan injection showed a significant increase in nitrite concentration ($7.15 \pm 0.87 \mu\text{M}$) compared with the group that received the saline injection ($1.76 \pm 0.59 \mu\text{M}$). Treatment with YEO reduces significantly nitrite concentration at doses of 100, and 200mg/kg (45.3, and 38.6% respectively) (Figure 4(c)).

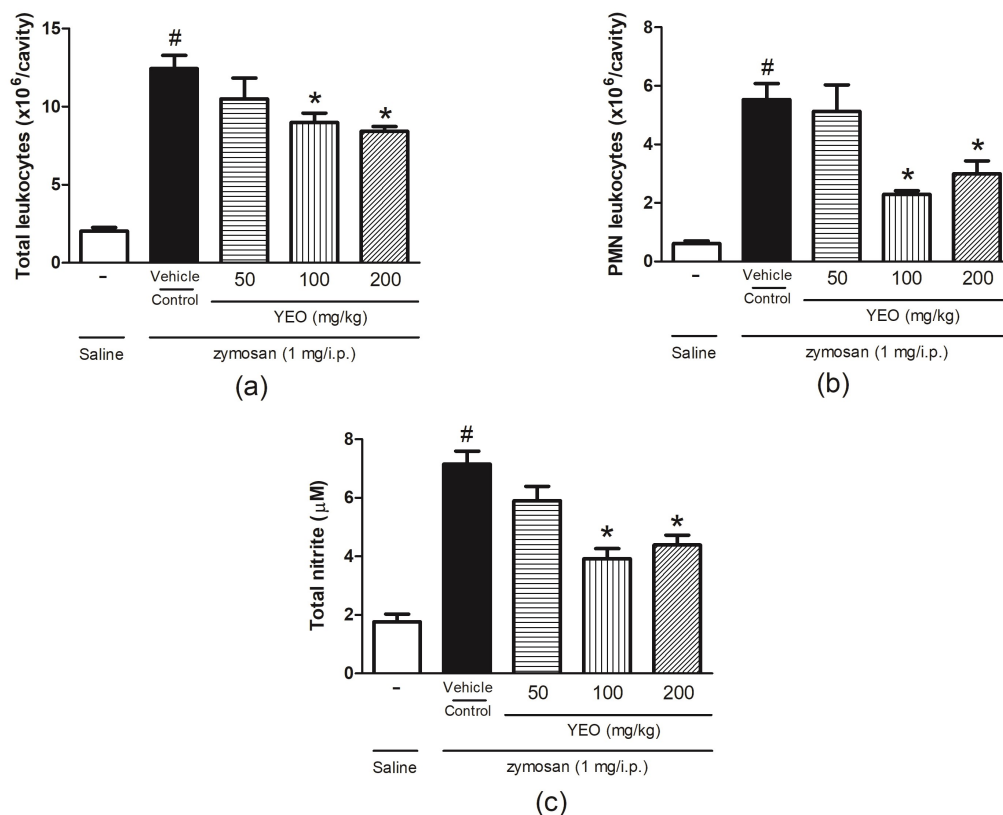


FIGURE 4: Effect of YEO treatment on migrated leukocyte number and NO production for peritoneal cavity of *Swiss* mice 6 hours after zymosan-induced peritonitis. Effect of YEO treatments on leukocyte counts 6 hours after zymosan injection (1 mg/cavity/i.p) in *Swiss* mice (a), on PMN number (b), and on NO production (c). $^{\#}P < 0.05$ compared to saline (vehicle). $^{*}P < 0.05$ compared to control group (ANOVA, Newman-Keul's test).

6.3.6. YEO treatment reduces leukocyte rolling and adhesion

The carrageenan injection (100 µg/cavity) into scrotum significantly increased rolling leukocyte number and leukocyte adhesion to the endothelium, 2 hours after stimulation, compared with the control group. YEO treatment at dose of 100, and 200 mg/kg significantly decreased rolling leukocytes by 51.9, and 50.92%, respectively (Figure 5(a)), and leukocyte adhesion by 45.6, and 38.75%, respectively (Figure 5(b)), compared to control group. Indomethacin, used as reference drug, reduced rolling leukocytes by 54.11% and leukocyte adhesion by 66.4%, compared to control group.

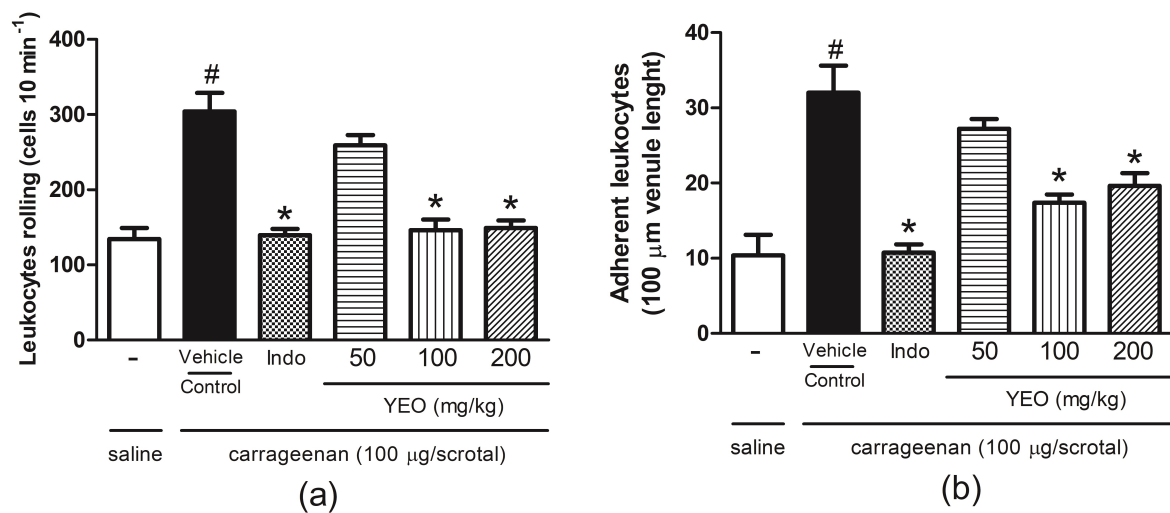


FIGURE 5: Effect of YEO on leukocyte rolling (a) and adhesion (b) induced by carrageenan. *Wistar* rats were orally pretreated with YEO, indomethacin, or vehicle. After 60 minutes, saline or carrageenan was injected into scrotum. Leukocyte rolling and adhesion were evaluated by intravital microscopy in the spermatic fascia 2 hours after carrageenan injection. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. [#] $P < 0.05$ versus saline. ^{*} $P < 0.05$ versus control group (ANOVA, Newman-Keuls's test).

6.3.7. YEO treatment reduces paw edema formation and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan

In paw edema and hyperalgesia carrageenan-induced model, carrageenan intraplantar injection promoted edema formation and hyperalgesia. YEO treatment showed anti-inflammatory activity, promoting significantly reduction of paw edema formation at doses of 100 and 200 mg/kg (Figure 6). YEO treatment at dose of 100 mg/kg promoted reduction of edema formation at all evaluated times, with maximum inhibition at 0.5 hour, inhibiting the formation of edema by 53.6%, compared to control group. At dose of 200 mg/kg, YEO

treatment promoted reduction of edema formation at times of 1, 2, and 4 hours after carrageenan injection, with maximum inhibition at 2 hours, reducing the formation of edema by 75.5%, compared to control group (Figure 6(a), 6(b), 6(c), and 6(d)). The indomethacin (reference drug) treatment promoted reduction of paw edema formation in all time-points tested. The YEO treatment at doses of 100 and 200 mg/kg also demonstrated antihyperalgesic activity, when administered by the oral route. Results showed a significant delayed reaction after 3 and 4 hours, inhibiting mechanical hyperalgesia (Figure 7(a) and 7(b)). At dose of 100 mg/kg, YEO treatment reduced mechanical hyperalgesia in 73.53, and 73.14% 3 and 4 hours after carrageenan injection, respectively, compared to control group. At dose of 200 mg/kg, YEO treatment reduced mechanical hyperalgesia in 58.76, and 65.43% in the times of 3 and 4 hours, respectively, compared to control group. Indomethacin (reference drug) treatment also reduced mechanical hyperalgesia in the times of 3 and 4 hours after carrageenan injection, compared to control group.

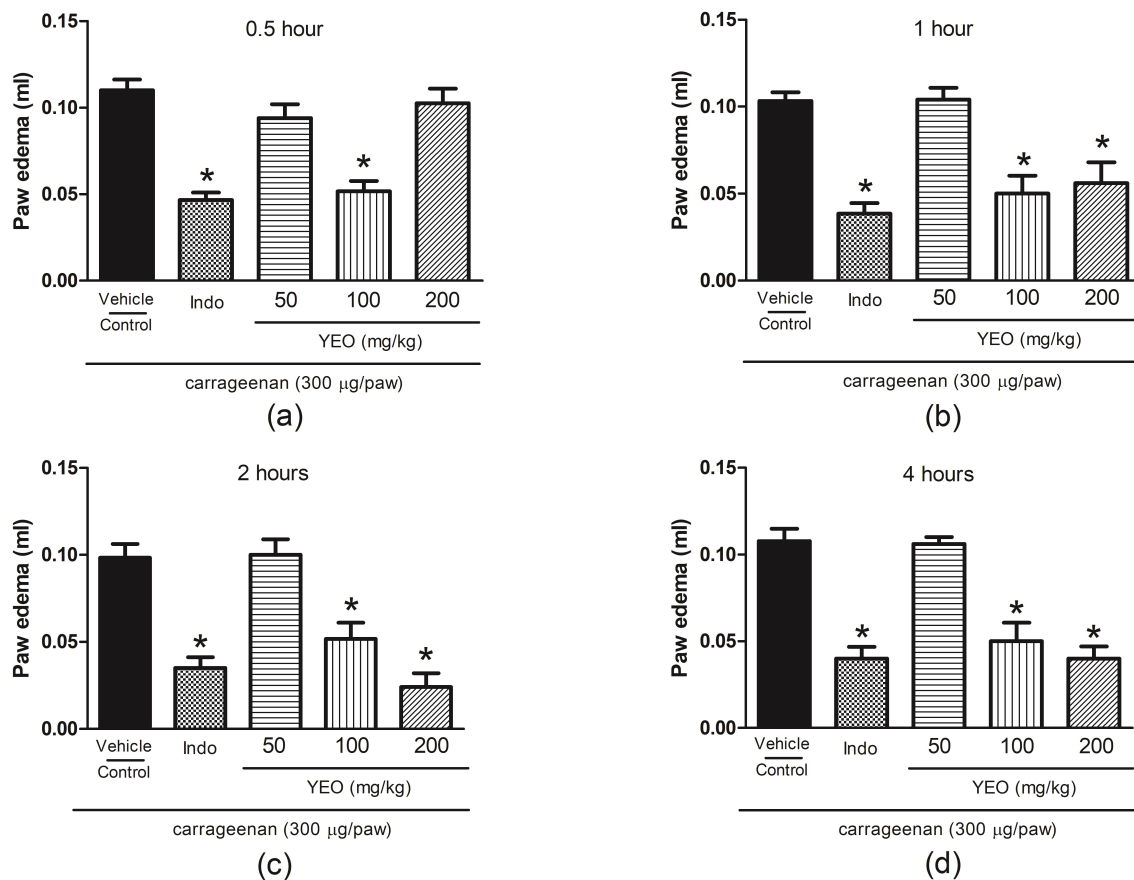


FIGURE 6: Effect of YEO treatments on carrageenan-induced paw edema in *Swiss* mice. The figure shows the values at 0.5 (a), 1 (b), 2 (c) and 4 (d) hours after the edema induction in the control (vehicle, p.o.), YEO (50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) and indomethacin (5 mg/kg, p.o.) groups. * $P < 0.05$ compared to control group (ANOVA, Newman-Keul's test).

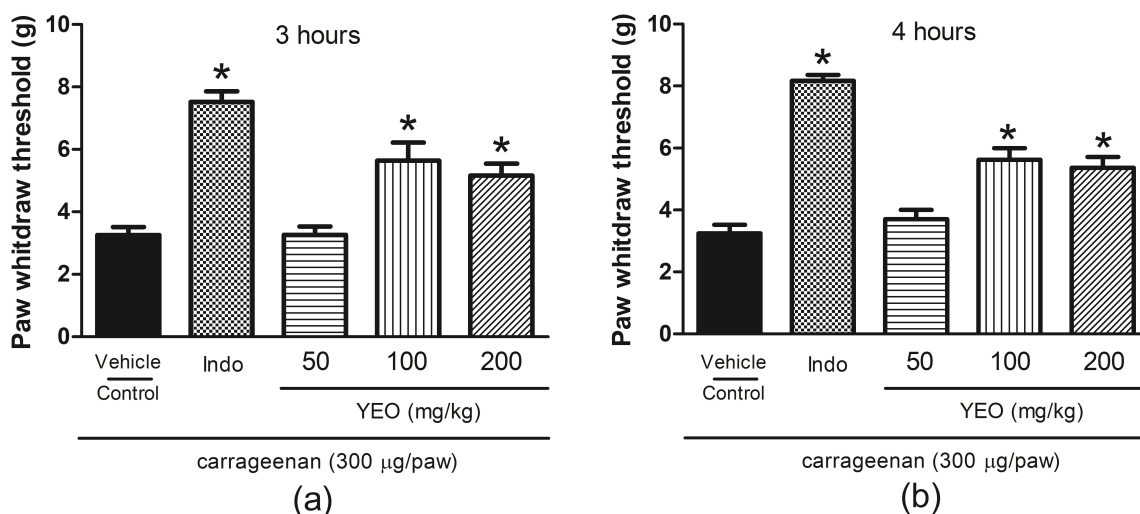


FIGURE 7: Effect of YEO treatments on carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in *Swiss* mice. The figure shows the values at 3 (a) and 4 (b) hours after the carrageenan injection in the control (vehicle, p.o.), YEO (50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) and indomethacin (5 mg/kg, p.o.) groups. * $P < 0.05$ compared to control group (ANOVA, Newman-Keul's test).

6.3.8. YEO treatment did not induce acute oral toxicity in vivo

Although essential oils and natural products have been widely used by the population, toxicological analysis is essential to ensure safe use. In this experiment, no signs or symptoms of acute and clinical oral toxicity were observed with the use of YEO in any animal. Thus, we can deduce that this essential oil has low toxicity and the Lethal Dose 50 (LD₅₀) is above 2000 mg/kg.

6.4. Discussion

In our work, the major constituents found in YEO are benzyl acetate, linalool, benzyl benzoate, and methyl benzoate, these compounds could be relevant to biological anti-inflammatory activities induced by YEO. The YEO composition is different of some prior studies, for example, another study with YEO had been shown the presence of geranyl acetate, cinnamyl acetate and farnesyl acetate, linalool, and geraniol, as major constituents [5]. Various factors can influence in the phytochemistry composition of essential oils from the aromatic plants and flowers, particularly the extraction method, extraction time, the flower conditions, geographical conditions, and climate and seasonal variations [34]. The present

study has shown the property of YEO against *in vitro* leukocytes chemotaxis, *in vitro* neutrophil phagocytosis, peritonitis induced by zymosan, leukocyte-endothelium interaction (*in situ* observation of the scrotal microcirculation), and paw edema and hyperalgesia induced by carrageenan.

Several studies report the effect of essential oils and compounds containing monoterpenes and sesquiterpenes on fMLP-induced leukocyte chemotaxis, with mechanisms involving the participation of pro-inflammatory cytokines [20, 24–27, 35, 36]. Studies with RAW264.7 cell culture demonstrated that YEO exhibited *in vitro* anti-inflammatory activity by inhibition of lipoxygenase enzyme [37]. Additionally, methanolic extract of *Cananga odorata* reduced NO release in RAW264.7 cell culture [19]. Nevertheless, our work is the first study that have demonstrated the effect of YEO in the reduction of *in vitro* neutrophil chemotaxis induced by fMLP. The fMLP is a chemoattractant that induces signal transduction events, leading to several cellular processes, including diapedesis, chemotaxis and migration of polymorphonuclear leukocytes (PMN) [38]. Chemotaxis is induced through the production of several pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8 and tumor necrosis factor (TNF), through mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) activation, crucial cascades in the development of functional responses and neutrophils in inflammation [39, 40]. Linalool, one constituent of YEO, attenuated the production of TNF, and IL-6 in cell culture stimulate by lipopolisaccharide (LPS) [41]. Therefore, the presence of linalool in the YEO composition may be contributing to the reduction of *in vitro* cell chemotaxis.

Recruitment and activation of neutrophils are crucial steps in the inflammatory process. The migration of these cells to the site of inflammation/infection is essential for the resolution of inflammation associated with an infectious process [42, 43]. Phagocytosis is essential for the microbicidal activity of neutrophils. However, the excessive activation of phagocytes may be related to a higher incidence of tissue damage in inflammatory processes [44–46]. YEO reduced the leukocytes chemotaxis toward fMLP at concentrations of 10, 30, 60, and 90 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, we chose the concentrations of 10, 30 and 90 $\mu\text{g/ml}$ to evaluate the effect of YEO on the *in vitro* phagocytic activity of neutrophils. YEO was reduced phagocytic activity of neutrophils in all concentrations tested. The YEO effect in the reducing of chemotaxis and phagocytic activity of neutrophils *in vitro* is not related to cytotoxicity, since YEO did not show cytotoxicity in the MTT test.

The YEO treatment reduced leukocyte recruitment in zymosan-induced peritonitis model, and the reduction of leukocyte migration is related to the reduction of PMN leukocytes

infiltration into peritoneal cavity. Some works report the effect of essential oils and terpenes in a zymosan-induced peritonitis model [25, 36, 47]. Zymosan is a polysaccharide component of the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*, widely used in the induction of experimental inflammation. Zymosan induces the inflammatory response by pro-inflammatory cytokines production, such as IL-1, IL-6, and TNF, chemokines and NO [48–50]. Kim et al. (2009) demonstrated that linalool, one constituent of YEO, reduced leukocyte infiltration in the ovalbumin-induced lung inflammation model, the proposed mechanism was the inhibition of NF-KB, the reduction in the production of proinflammatory cytokines and NO [51].

During the inflammatory process, NO is produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) from L-arginine and is an important mediator involved in the regulation and leukocyte activation [52]. NO plays a key role in the pathogenesis of inflammation, the overproduction of this pro-inflammatory mediator promotes cell activation and tissue damage [53]. Our results suggest that treatment by YEO reduced leukocyte recruitment, and it could be involved in the decrease of the NO production as observed in the peritoneal exudate, as showed in our results. However, the other mediator inhibition, such as pro-inflammatory cytokines, may be involved in action mechanism of YEO. However, more studies are needed to confirm this mechanism.

In order to investigate what steps of leukocyte migration are decreased by YEO in the inflammatory site, intravital microscopy system was utilized. The effect of YEO administration on the *in situ* microcirculation was evaluated in internal spermatic fascia postcapillary venules of *Wistar* rat. Thus, our results showed that YEO treatment reduces rolling and adhesion of leukocytes, similar to that observed with the indomethacin treatment (the reference drug). Carrageenan induced pro-inflammatory effects in the peritoneal cavities include cellular activation, and release of pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-6, IL-1 β), prostanoids and NO [54]. These mediators have the ability to induce the expression of vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and selectins, culminating with processes of rolling and leukocyte adhesion [55]. Indomethacin (used as reference drug) reduces expression of adhesion molecules, such as L-selectin and E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 [56, 57]. In a similar manner, YEO could also be acting on the expression of adhesion molecules, or acting on mediators involved in the expression of these molecules. Several studies have demonstrated the effect of essential oils and terpenes in the reduction of rolling and leukocyte adhesion [20, 25, 26, 58].

In carrageenan-induced paw model, YEO inhibited edema, and mechanical hyperalgesia at doses of 100 and 200 mg/kg. In the time course curve, the greatest inhibition

of paw edema was observed at 0.5 hour, at dose of 100 mg/kg, and 2 hours, at dose of 200 mg/kg, after carrageenan paw injection, while significant antinociceptive response (mechanical hyperalgesia) was detected in all times analyzed, at doses of 100 and 200 mg/kg. The carrageenan intraplantar injection promotes paw edema, inflammatory cell infiltration, the release of inflammatory mediators such as IL-1 β , and IL-6, increase of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, and prostaglandin E₂ (PGE₂) release [59]. Several works have demonstrated the effect of essential oils and terpenes in the inhibition of paw edema and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan [27, 60, 61]. Linalool, a terpene found in YEO, also reduces paw edema in carrageenan-induced inflammation [21]. Was also demonstrated that the ethanolic extract obtained of *Cananga odorata* fruit reduces paw edema induced by carrageenan in rats [22].

In our study, all doses of YEO used in the *in vivo* tests are considered safe. In the acute toxicity assay, there were no death or any signs of toxicity observed after the administration of the YEO, having LD₅₀ value above 2000 mg/kg. Although some pharmacological properties of YEO are described in the literature, such as anxiolytic and antidepressant effects [62, 63], this work is the first in the literature to demonstrate the effect of this essential oil on the acute inflammatory response. The presence of linalool in the YEO composition could contribute for anti-inflammatory activity, however the presence of other compounds could not be discarded.

6.5. Conclusion

In conclusion, YEO presented anti-inflammatory activity. YEO reduces the leukocyte activation during acute inflammatory response. The mechanism proposed of YEO seems to be, at least in part, involving the NO participation. The study of acute toxicity indicated that the YEO orally single administration did not cause any death and no changes in general behavior in mice. Further studies are needed to elucidate the mechanism of the action of this essential oil on the inflammatory response.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflict of interests

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

Acknowledgment

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil (process no. 426172/2018-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

References

- [1] I. Giannenas, E. Sidiropoulou, E. Bonos, E. Christaki, and P. Florou-Paneri, “The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts,” in *Feed Additives*, Elsevier, 2020, pp. 1–18.
- [2] A. E. Edris, “Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review.,” *Phytother. Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 308–23, Apr. 2007.
- [3] W. Dhifi, S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, and W. Mnif, “Essential Oils’ Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review,” *Medicines*, vol. 3, no. 4, p. 25, Sep. 2016.
- [4] A. F. Ahmed, F. A. K. Attia, Z. Liu, et al., “Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants,” *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 8, no. 3, pp. 299–305, Sep. 2019.
- [5] L. T. H. Tan, L. H. Lee, W. F. Yin, et al., “Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang),” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015, pp. 1–30, 2015.
- [6] P. Indrasetiawan, C. Aoki-Utsubo, M. Hanafi, et al., “Antiviral Activity of *Cananga odorata* Against Hepatitis B Virus,” *Kobe J. Med. Sci.*, vol. 65, no. 2, pp. E71–E79, Nov. 2019.

- [7] I. Ahmad and A. Z. Beg, "Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 74, no. 2, pp. 113–123, Feb. 2001.
- [8] J. Nguyen-Pouplin, H. Tran, H. Tran, et al., "Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 109, no. 3, pp. 417–427, Feb. 2007.
- [9] I. W. Kusuma, Murdiyanto, E. T. Arung, Syafrizal, and Y. Kim, "Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia," *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 3, no. 3–4, pp. 191–196, Sep. 2014.
- [10] R. Pujiarti, Y. Ohtani, T. B. Widowati, et al., "Effect of *Melaleuca leucadendron*, *Cananga odorata* and *Pogostemon cablin* oil odors on human physiological responses," *Wood Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 100–105, 2012.
- [11] Y. Shahbazi, "Variation in Chemical Composition of Essential Oil of *Ferulago angulata* Collected from West Parts of Iran," *Pharm. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 16–21, Mar. 2016.
- [12] L. Chen, H. Deng, H. Cui, et al., "Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs.," *Oncotarget*, vol. 9, no. 6, pp. 7204–7218, Jan. 2018.
- [13] L. Ferrero-Miliani, O. H. Nielsen, P. S. Andersen, and S. E. Girardin, "Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 147, no. 2, pp. 227–35, Feb. 2007.
- [14] O. Takeuchi and S. Akira, "Pattern recognition receptors and inflammation.," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–20, Mar. 2010.
- [15] L. M. van Loon, R. F. Stolk, J. G. van der Hoeven, et al., "Effect of Vasopressors on the Macro- and Microcirculation During Systemic Inflammation in Humans In Vivo," *Shock*, vol. 53, no. 2, pp. 171–174, Feb. 2020.
- [16] C. T. Robb, K. H. Regan, D. A. Dorward, and A. G. Rossi, "Key mechanisms governing resolution of lung inflammation.," *Semin. Immunopathol.*, vol. 38, no. 4, pp. 425–48, 2016.
- [17] M. T. Silva, "Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 89, no. 5, pp. 675–83, May 2011.
- [18] S. Bindu, S. Mazumder, S. Dey, et al., "Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- κ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-

- inflammatory drug,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 456–467, Dec. 2013.
- [19] E.-M. Choi and J.-K. Hwang, “Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW264.7 cells and antioxidant activity,” *Fitoterapia*, vol. 76, no. 2, pp. 194–203, Mar. 2005.
- [20] C. F. Estevão-Silva, R. Kummer, F. C. Fachini-Queiroz, et al., “Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB₄, and carrageenan,” *J. Nat. Med.*, vol. 68, no. 3, pp. 567–575, Jul. 2014.
- [21] A. T. Peana, P. S. D’Aquila, F. Panin, et al., “Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils,” *Phytomedicine*, vol. 9, no. 8, pp. 721–726, Jan. 2002.
- [22] Y.A. Maniyar and C.H.J. Devi, “Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Cananga odorata* Lam in experimental animals,” *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.*, p. 1, 2015.
- [23] H. A. O. Cavalcante, S. E. Silva-Filho, L. A. M. Wiirzler, et al., “Effect of (-)- α -Bisabolol on the Inflammatory Response in Systemic Infection Experimental Model in C57BL/6 Mice,” *Inflammation*, vol. 43, no. 1, 2020.
- [24] F. C. Fachini-Queiroz, R. Kummer, C. F. Estevão-Silva, et al., “Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2012, pp. 1–10, 2012.
- [25] S. E. Silva-Filho, L. A. M. Wiirzler, H. A. O. Cavalcante, et al., “Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on in vitro and in vivo leukocytes behavior in acute inflammatory response,” *Biomed. Pharmacother.*, Nov. 2016.
- [26] F. M. de S. Silva-Comar, L. A. M. Wiirzler, S. E. Silva-Filho, et al., “Effect of Estragole on Leukocyte Behavior and Phagocytic Activity of Macrophages,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2014, pp. 1–7, 2014.
- [27] G. F. E. Cardia, S. E. Silva-Filho, E. L. Silva, et al., “Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2018, pp. 1–10, 2018.
- [28] K. A. Möller, B. Johansson, and O. G. Berge, “Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 84, no. 1–2, pp. 41–7, Oct. 1998.
- [29] OECD, “Organisation for economic Co-operation and development. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-And-Down-Procedure (UDP) 27 Head of Publications Service, Paris,” 2008.

- [30] S. E. L. T. Menegati, F. Freitas de Lima, G. K. Traesel, et al., “Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 194, pp. 1096–1102, Dec. 2016.
- [31] U. Saleem, S. Amin, B. Ahmad, et al., “Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG,” *Toxicol. Reports*, vol. 4, pp. 580–585, 2017.
- [32] M. H. Malone and R. C. Robichaud, “A hippocratic screen for pure or crude drug materiais,” *J Nat Prod - Lloydia*, vol. 25, no. 4, pp. 320–331, 1962.
- [33] G. K. Traesel, J. C. de Souza, A. L. de Barros, et al., “Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 74, pp. 320–325, Dec. 2014.
- [34] E. Stashenko, J. R. Martinez, C. MacKu, and T. Shibamoto, “HRGC and GC-MS analysis of essential oil from colombian ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook fil. et Thomson,forma genuina),” *J. High Resolut. Chromatogr.*, vol. 16, no. 7, pp. 441–444, Jul. 1993.
- [35] N. S. Uchida, S. E. Silva-Filho, R. P. Aguiar, et al., “Protective Effect of *Cymbopogon citratus* Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Liver Injury,” *Am. J. Chin. Med.*, vol. 45, no. 3, 2017.
- [36] R. Kummer, F. C. Fachini-Queiroz, C. F. Estevão-Silva, et al., “Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Citrus latifolia* Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, pp. 1–8, 2013.
- [37] A. Wei and T. Shibamoto, “Antioxidant/Lipoxygenase Inhibitory Activities and Chemical Compositions of Selected Essential Oils,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 12, pp. 7218–7225, Jun. 2010.
- [38] C. G. J. Moonen, J. Hirschfeld, L. Cheng, et al., “Oral Neutrophils Characterized: Chemotactic, Phagocytic, and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation Properties,” *Front. Immunol.*, vol. 10, Mar. 2019.
- [39] A. Mócsai, Z. Jakus, T. Vántus, et al., “Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 8, pp. 4321–31, Apr. 2000.
- [40] R. E. Uthayashanker and M. H. Rita, “Preliminary screening of anti-inflammatory effect of phytochemicals on chemotaxis of human neutrophils,” *J. Pharmacogn. Phyther.*, vol. 7, no. 8, pp. 183–188, Aug. 2015.

- [41] M. Huo, X. Cui, J. Xue, et al., “Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model,” *J. Surg. Res.*, vol. 180, no. 1, pp. e47–e54, Mar. 2013.
- [42] D. C. Dale, L. Boxer, and W. C. Liles, “The phagocytes: neutrophils and monocytes,” *Blood*, vol. 112, no. 4, pp. 935–45, Aug. 2008.
- [43] G. K. Aulakh, “Neutrophils in the lung: ‘the first responders’,” *Cell Tissue Res.*, vol. 371, no. 3, pp. 577–588, Mar. 2018.
- [44] E. Saito, R. Kuo, R. M. Pearson, et al., “Designing drug-free biodegradable nanoparticles to modulate inflammatory monocytes and neutrophils for ameliorating inflammation,” *J. Control. Release*, vol. 300, pp. 185–196, 2019.
- [45] A. N. Rao, N. M. Kazzaz, and J. S. Knight, “Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases?,” *World J. Cardiol.*, vol. 7, no. 12, pp. 829–42, Dec. 2015.
- [46] H. Safari, W. J. Kelley, E. Saito, et al., “Neutrophils preferentially phagocytose elongated particles—An opportunity for selective targeting in acute inflammatory diseases,” *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 24, p. eaba1474, Jun. 2020.
- [47] M. Golab, O. Burdzenia, P. Majewski, and K. Skwarlo-Sonta, “Tea tree oil inhalations modify immunity in mice,” *J. Appl. Biomed.*, vol. 3, no. 2, pp. 101–108, Jul. 2005.
- [48] R. Bellavita, F. Raucci, F. Merlino, et al., “Temporin L-derived peptide as a regulator of the acute inflammatory response in zymosan-induced peritonitis,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 123, p. 109788, Mar. 2020.
- [49] M. N. Ajuebor, L. Virág, R. J. Flower, M. Perretti, and C. Szabó, “Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation,” *Immunology*, vol. 95, no. 4, pp. 625–30, Dec. 1998.
- [50] T. Kawai and S. Akira, “Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors,” *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 11, pp. 460–9, Nov. 2007.
- [51] M.-G. Kim, S.-M. Kim, J.-H. Min, et al., “Anti-inflammatory effects of linalool on ovalbumin-induced pulmonary inflammation,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 74, p. 105706, Sep. 2019.
- [52] M. A. Cinelli, H. T. Do, G. P. Miley, and R. B. Silverman, “Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition,” *Med. Res. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 158–189, Jan. 2020.
- [53] J. N. Sharma, A. Al-Omran, and S. S. Parvathy, “Role of nitric oxide in inflammatory diseases,” *Inflammopharmacology*, vol. 15, no. 6, pp. 252–259, Dec. 2007.

- [54] N. M. N. Alencar, R. S. B. Oliveira, J. G. Figueiredo, et al., “An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models,” *Inflamm. Res.*, vol. 59, no. 4, pp. 245–54, Apr. 2010.
- [55] A. J. E. Seely, J. L. Pascual, and N. V Christou, “Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance,” *Crit. Care*, vol. 7, no. 4, pp. 291–307, Aug. 2003.
- [56] F. Díaz-González, I. González-Alvaro, M. R. Campanero, et al., “Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs,” *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 4, pp. 1756–65, Apr. 1995.
- [57] A. Sakai, “Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide,” *Life Sci.*, vol. 58, no. 26, pp. 2377–87, May 1996.
- [58] G. A. Nogueira de Melo, R. Grespan, J. P. Fonseca, et al., “Inhibitory effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in vivo and in vitro,” *J. Nat. Med.*, vol. 65, no. 1, pp. 241–246, Jan. 2011.
- [59] Z. Ou, J. Zhao, L. Zhu, et al., “Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 118, p. 109347, Oct. 2019.
- [60] I. A. Ogunwande, O. N. Avoseh, K. N. Olasunkanmi, et al., “Chemical composition, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 232, pp. 188–192, Mar. 2019.
- [61] E. dos Santos, M. M. Leitão, C. N. Aguero Ito, et al., “Analgesic and anti-inflammatory articular effects of essential oil and camphor isolated from *Ocimum kilimandscharicum* Gürke leaves,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 269, p. 113697, Apr. 2021.
- [62] N. Zhang, L. Zhang, L. Feng, and L. Yao, “The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents,” *Phytomedicine*, vol. 23, no. 14, pp. 1727–1734, Dec. 2016.
- [63] N. Zhang, L. Zhang, L. Feng, and L. Yao, “*Cananga odorata* essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 219, pp. 23–30, Jun. 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de produtos naturais com atividade anti-inflamatória é de grande relevância e tem crescido nos últimos tempos. Os fármacos anti-inflamatórios utilizados classicamente podem ocasionar reações adversas importantes, como problemas gástricos, renais e cardiovasculares. Sendo assim, essa pesquisa contribuiu na busca de tratamentos alternativos para doenças inflamatórias, com eficácia e possível minimização de danos decorrentes da terapêutica farmacológica clássica para o tratamento de condições inflamatórias.

Nesta pesquisa, foi demonstrado que o OEY, um produto de origem natural, pode ser uma alternativa no tratamento de processos inflamatórios agudos com excessiva migração leucocitária. Além disso, este trabalho demonstrou que o OEY não apresenta citotoxicidade *in vitro*, além de apresentar DL_{50} acima de 2000 mg/kg no teste de toxicidade aguda *in vivo* em camundongos, sendo considerado um produto seguro.

As várias atividades biológicas descritas para o OEY demonstram que este óleo essencial pode ser explorado na busca de novas alternativas terapêuticas para diversas doenças. Portanto, este trabalho contribuiu para elucidar ainda mais as atividades biológicas do OEY. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para confirmar os exatos mecanismos de ação deste óleo essencial, bem como os possíveis efeitos tóxicos que podem ocorrer com o uso deste produto a longo prazo.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

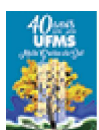
Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização química e avaliação do efeito do óleo essencial de Ylang-ylang (*Cananga odorata*) sobre a resposta inflamatória aguda em roedores”, registrada com o nº 1.101/2019, sob a responsabilidade de **SAULO EUCLIDES SILVA FILHO** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 1ª reunião ordinária do dia 17/02/2020.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2019 a 01/03/2022
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	176
Peso/Idade	18-25 gramas / 4-6 semanas
Sexo	166 Machos 10 Fêmeas
Origem	UT-Biotério/UFMS

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 18 de fevereiro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria**, **Presidente de Comissão**, em 19/02/2020, às 11:09, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1798077** e o código CRC **OCF21A40**.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.041225/2019-71

SEI nº 1798077