

d0f7-39bd-8947-5b90d40e49a1>. Acesso em: Abr. 2018.

WU, S.; ZHUANG, G.; BAI, Z.; CEN, Y.; XU, S.; SUN, H.; HAN, X.; ZHUANG, X. Mitigation of nitrous oxide emissions from acidic soils by *Bacillus amyloliquefaciens*, a plant growth-promoting bacterium. **Global Change Biology**, v. 24, n. 1, p. 1-14, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251817>>. Acesso em Abr. 2018.

ZHAO, B.; LIU, Z.; ATA-UI-KARIM, S. T.; XIAO, J.; LIU, Z.; QI, A.; NING, D.; NAN, J.; DUAN, A. Rapid and nondestructive estimation of the nitrogen nutrition index in winter barley using chlorophyll measurements. **Fild Crops Research**, v. 185, p. 59-68, 2016. Disponível em: <<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-6cef0fbc-f5d1-36af-a627-2494f708668e>>. Acesso em: Abr. 2018.

ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311914609667>>. Acesso em: Abr. 2018.

EFEITO DO FITOFÁRMACO MENTALIV® SOBRE FUNÇÕES DE NEUTRÓFILOS E EOSINÓFILOS

GILENO, Miriane Costa* - Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Araraquara, UNIARA, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara, UNESP; FONSECA, Luis Marcos. - Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara, UNESP; RODRIGUES, Vanderlei. - Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, USP; SOARES, Edson Garcia. - Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP; SACRAMENTO, Luis Vitor Silva. - Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar; ANIBAL, Fernanda Freitas. - Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIARA, *Autor para correspondência e-mail: mcostagileno@yahoo.com.br

Recebido em: 10/06/2018
Aprovação final em: 15/09/2018

Doi: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2019.v22i1.588>

RESUMO: A *Mentha piperita* L. tem sido estudada pelo nosso grupo como possível fitofármaco para tratamento de doenças que promovem respostas inflamatórias intensa, mediadas por eosinófilos e neutrófilos. Assim, analisar os efeitos antioxidantes e produção de citocinas por essas células é importante para entender o efeito desses compostos na resposta imune inata e efetora. Dessa forma, utilizou-se um fitofármaco (Mentaliv®) proveniente da *M. piperita* e avaliou a enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos por meio da quimiluminescência dependente de luminol (QLDLum) e da lucigenina. E os níveis de IL-4, IL-6 e TNF- α e a QLDLum em eosinófilos. Nossos resultados demonstraram que em neutrófilos houve inibição da produção de radical ânion superóxido e da NADPH oxidase após tratamento com o fitofármaco. Entretanto, os níveis de IL-4 foi maior após o tratamento. Esses dados sugerem que esse fitofármaco apresenta atividade anti-inflamatória, por meio do controle dos produtos secretados durante as respostas inflamatórias, principalmente como pode ocorrer durante infecções e processos inflamatórios crônicos de diversas doenças, onde se observa uma acentuada eosinofilia tecidual, com presença significativa de PMN no sangue e no tecido.

PALAVRAS-CHAVE: *Mentha piperita*; Neutrófilos; Eosinófilos.

EFFECT OF PHYTOPHARMACEUTICAL MENTALIV® ON NEUTROPHIL AND EOSINOPHIL FUNCTIONS

ABSTRACT : *Mentha piperita* L. has been studied by our group as a possible phytopharmacological drug for the treatment of diseases that promote intense inflammatory responses mediated by eosinophils and neutrophils. Thus, the analysis of antioxidant effects and cytokine production by these cells is important to understand the effect of these compounds on the innate and effector phase of adaptive immune response. In this way, an essential oil from *M. piperita* (Mentaliv®) was used and the myeloperoxidase enzyme activity (MPO) in neutrophils was evaluated by luminol-dependent chemiluminescence assay (QLDLum) and lucigenin (QLDLuc). The levels of IL-4, IL-6 and TNF- α and QLDLum in eosinophils were also evaluated. Our results showed an inhibition of the production of superoxide anionic radicals and NADPH oxidase in neutrophils after the essential *M. piperita* oil treatment. However, IL-4 levels were increased after treatment. These data suggest that this phytopharmaceutical has anti-inflammatory activity, by controlling the secreted products during the inflammatory responses, mainly as can occur during infections and chronic inflammatory processes of several diseases, which present a strong tissue

eosinophilia with significant presence of PMN in blood and tissue.

KEYWORDS: *Mentha piperita*; Neutrophils; Eosinophils.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática secular baseada no conhecimento popular e transmitida durante gerações; desta forma, agregar garantias científicas a essa prática terapêutica traz variadas vantagens, como baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos e evitar ou diminuir os riscos de intoxicação por uso inadequado (NASCIMENTO *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2007). Neste sentido, a investigação de substâncias naturais como fonte de novos agentes terapêuticos tem aumentado potencialmente, onde diferentes extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas têm sido testados (NASCIMENTO *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2007; DINIS, 2010; GONÇALVES *et al.* 2009).

A *Mentha piperita* L, conhecida como hortelã pimenta é popularmente usada para fins terapêuticos e alimentícios (LORENZI; MATOS, 2002). Embora sua origem seja a Europa e o Oriente Médio, a *M. piperita* L. está bem difundida na cultura brasileira e pode ser cultivada em qualquer área do território nacional. Tem-se verificado cientificamente o uso popular de plantas com a finalidade de obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos, incluindo sua aplicação como antimicrobianos e vermífugos (CASTRO *et al.*, 2007; BURT, 2004).

De acordo com a literatura, diversos compostos químicos descritos foram isolados a partir das folhas da planta e do seu óleo extraído. Os ácidos graxos, da fração lipídica não-polar são determinados pelos ácidos palmítico e linoléico. O principal componente volátil é o mentol (33-60%), seguido de mentona (15-32%), isomentona (2-8%), 1,8-cineol (Eucaliptol) (5-13%), acetato de menthyl (2-11%), mentofurano (1-10%), limoneno (1-7%), β -mirceno (0,1-1,7%), β -cariofileno (2-4%), pulegona (0,5-1,6%) e carvona (1%) (ZHELJAZKOV *et al.*, 2010; ISCAN *et al.* 2002; SCAVRONI *et al.* 2005).

Alguns autores mostraram que o uso do extrato etanólico dessa planta reduziu e alterou a morfologia e a viabilidade da *Giardia lamblia* *in vitro* (VIDAL *et al.*, 2007). No que se refere ao óleo essencial de *Mentha piperita*, ele possui ação contra várias cepas bacterianas, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, entre outras (SARTORATTO *et al.* 2004; AGGARWAL *et al.* 2002; AH MAD e BEG, 2001; AMR e EMAN, 2003; ANSARI *et al.* 2000) e atividade antileishmanicida e virucida (BRITO, 2007; LEITE *et al.* 2009; SCHUHMACHER *et al.* 2003).

A escolha dos neutrófilos para os ensaios antioxidantes, se dá por serem células que constituem um importante componente da defesa inata do organismo contra patógenos e usualmente são as primeiras células a chegarem aos locais de infecção e/ou inflamação (VERHOC; VISSER, 1993). Para destruir os patógenos fagocitados, o neutrófilo utiliza procedimentos oxidativos e não oxidativos. Há tempo, foi descoberto que neutrófilos durante o processo fagocitário consomem oxigênio (IYER *et al.*, 1961) que é protagonizado por um complexo enzimático conhecido como NADPH oxidase de membrana (CHANOCK, 1994; SEGAL; ABO, 1993). O sistema NADPH oxidase nos neutrófilos, constitui um modelo essencial nas respostas imunológicas, no entanto, também está envolvido no dano tissular associado a muitas doenças inflamatórias, principalmente as crônicas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser consideradas como intermediários benéficos em relação à ação bactericida, mas também podem ser deletérias ao próprio tecido em condições de estimulação prolongada. Uma das enzimas chaves na via oxidativa é a mieloperoxidase (MPO). A MPO (E.C. 1.11.1.7, MPO) é uma enzima que contém heme e na presença de peróxido de hidrogênio é efetiva na morte de vários microrganismos, além de exercer uma grande

variedade de funções extracelulares, as principais fontes dessa enzima são leucócitos polimorfonucleares, sendo uma enzima específica da série mielóide (TOBLER; KOEFFLER, 1991). O mecanismo da ação da MPO envolve a sua forma férrica com H_2O_2 (MPO I), o qual oxida Cl^- formando HOCl e este último oxida outras biomoléculas, como a taurina formando cloraminas que também é importante na destruição de microrganismos (HAMPTON *et al.*, 1998). Vários estudos colocam os neutrófilos como células chaves, influenciando fortemente o direcionamento da resposta imunológica na imunidade inespecífica. (FERRANT *et al.*, 1991); IL-1 (MCCOLL *et al.*, 1992) e IL-8 (BROADDUS *et al.*, 1994; CASSATELLA, 1995; GROSS *et al.*, 1992; BARR *et al.*, 2017; FERRANT *et al.* 1991).

Eosinófilos foram observados pela primeira vez por Wharton Jones em 1846, em preparações não coradas de sangue periférico (KITA, 2013). O citoplasma dos eosinófilos é rico em grânulos contendo proteínas catiônicas, como a Proteína Básica Maior (MBP); a Proteína Catiônica dos Eosinófilos (ECP); a Proteína Neurotóxica dos Eosinófilos (EDN) e a Peroxidase dos Eosinófilos (EPO), além de outras enzimas como colagenase e cristais de Charcot-Leyden (CLC), que é uma proteína com atividade de lisofosfolipase e expressam também moléculas de adesão como LFA-1, Mac-1 e VLA-4 que estão envolvidas na sua aderência ao endotélio vascular (KITA, 2013). Tais granulócitos podem também secretar uma série de potentes mediadores como, LTB_4 , LTC_4 , PGE-1, PAF (Fator Ativador de Plaquetas) e citocinas como GM-CSF, CXCL8, IL-3, IL-4, IL-10 e $IFN-\gamma$ (KITA, 1996; BANDEIRA-MELO *et al.* 2001).

A migração dos eosinófilos do sangue para os tecidos é dependente de vários fatores quimiotáticos e na fase crônica de doenças torna-se fundamental para mediar a gravidade do processo inflamatório, onde o seu número aumentado contribui para ampliação da resposta inflamatória, assim como para potencializar formação de granuloma, e conseqüentemente contribuindo para o desenvolvimento de fibrose em alguns tipos de infecção parasitária (ARAÚJO *et al.*, 1999; DEJANI *et al.* 2014; CHITSULO *et al.* 2000; MEEUSEN; BALIC 2000; MELO *et al.* 2009).

Dessa forma, a escolha do neutrófilo e do eosinófilo com importantes células da imunidade inespecífica se faz de grande valia para esse estudo. E como há algum tempo nosso grupo busca avaliar a atividade anti-inflamatória da *M. piperita* em diferentes modelos de doenças parasitárias, tivemos como objetivo determinar quais os efeitos desses compostos na atividade efetora de neutrófilos e eosinófilos *in vitro*.

MATERIAL E Métodos

FITOFÁRMACO

Óleo essencial de *Mentha piperita* (cápsula gelatinosa mole revestida de 200 mg- nome comercial MENTALIV®), contendo 30 % -55% de mentol e 14%-32% de mentona, laboratório Apsen.

SEPARAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos foram isolados do sangue periférico de indivíduos normais por gradiente de densidade usando Histopaque 1077/1119, logo após coleta com o ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (ENGLISH; ANDERSEN, 1974). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com humanos, sob o protocolo n°. 1047/09.

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS DO “BURST” OXIDATIVO. ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DO LUMINOL (QLDLUM)

A oxidação do luminol pode ocorrer tanto pelo sistema MPO/ H_2O_2 (ação peroxidásica) como devido a reação luminol/HOCl com a formação de uma diazoquinona que posteriormente reage com H_2O_2 formando aminoftalato eletronicamente excitado, que ao voltar para o estado fundamental emite luz

(ALLEN, 2000), portanto a quimiluminescência dependente do luminol (QLDLum) é utilizada para detecção de todas as ERO formadas no “burst” oxidativo.

Para a realização dos testes adicionou-se a placa de leitura: tampão PBS suplementado, luminol (1×10^{-5} M), suspensão celular de neutrófilos (1×10^6 células/mm³), o fitofármaco em diferentes concentrações diluído em PBS (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, e 500 µg/mL) e zymozan opsonizado. O tempo de reação foi de 30 minutos (GALICE *et al.*, 2006; KITAGAWA *et al.*, 2003).

AValiação da inibição da produção de EROS do “BURST” oxidativo. Ensaio de Quimiluminescência dependente da lucigenina (QLDLUC)

A lucigenina (Nitrato bis-N-metil acridina) é usada especificamente para quantificação da geração de radical ânion superóxido no “burst” respiratório de neutrófilos e outras células (ALVES *et al.*, 2003; GASPARINI *et al.*, 1998). A reação se inicia com a redução univalente da lucigenina para o radical correspondente, que então reage com o ânion superóxido, para produzir um intermediário dioxetano, que é decomposto em duas moléculas de acridina, estando uma delas no estado eletrônico excitado e capaz de emitir luz ao retornar ao estado fundamental (FAULKNER; FRIDOLVICH 1993; SPASOJEVIC *et al.*, 2000).

Para a realização do teste a lucigenina se encontrava na concentração final de 10 µM e manteve-se as condições de reação da avaliação da quimiluminescência do luminol (KITAGAWA *et al.*, 2003).

AValiação do efeito da mistura MENTOL/MENTONA no sistema MPO/H₂O₂ - ENSAIO COM TMB

Avaliou-se o efeito do fitofármaco em diferentes concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, e 500 µg/mL) na oxidação do segundo a técnica de Marques e Dunford (1997).

LEUCOTOXICIDADE (ESTUDO MORFOLÓGICO)

Foram adicionados em tubos tipo *ependorf*: PBS, neutrófilos (1×10^6 células/mL), diferentes concentrações do fitofármaco (concentrações finais: 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, e 500 µg/mL) e PMA (0,1 µM). O tempo de incubação foi de trinta minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL da reação foram transferidos para uma citocentrífuga (CytoSpin) para confecção de lâmina e posterior coloração com corante hematológico (May Grounwald/Giemsa). A leitura das lâminas foi realizada em objetiva de imersão (100x), determinando-se qualitativamente a morfologia celular das lâminas em relação aos controles positivo e negativo.

OBTENÇÃO DE EOSINÓFILOS DE CAMUNDONGOS (SPEIRS AND DREISBACH, 1955)

Utilizando-se soro de cavalo 1:50 em solução fisiológica, foram realizadas 5 a 7 injeções subcutâneas (intraperitoneal), 0,5 mL a cada 48 horas nos ratos. Após a última injeção aguardou-se 24 horas. Os ratos foram sacrificados em câmara de CO₂, os eosinófilos foram obtidos lavando-se a cavidade abdominal com PBS.

Para a dosagem de citocinas, as células foram incubadas ou não com a mistura mentol/mentona em diferentes concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, e 500 µg/mL) por 30 minutos a 37° C, após os tubos contendo as células foram centrifugados a 500 g por 10 minutos e o sobrenadante livre de células foi coletado e submetido a congelamento à -20°C até o momento do ensaio de quantificação de citocinas (IL-4, IL-6 e TNF-α) por ensaio imunoenzimático. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos –CEEA-/UFSCar, protocolo nº. 008/2009.

AValiação da inibição da produção de EROS do “BURST” oxidativo. Ensaio de Quimiluminescência dependente do luminol (QLDLUM) com eosinófilos

A peroxidase eosinofílica (EPO) tem 80 % de homologia com a mieloperoxidase (MPO). A oxidação do luminol pode ocorrer tanto pelo sistema peroxidase/H₂O₂ (ação peroxidásica) como devido a reação luminol/HOCl (ALLEN 2000), portanto a quimiluminescência dependente do luminol (QLDLum) é utilizada para detecção de todas as ERO formadas no “burst” oxidativo, também em eosinófilos.

A mesma solução de luminol e zymozan utilizadas na quimiluminescência com neutrófilos foi utilizada na quimiluminescência com eosinófilos. O fitofármaco foi preparado na seguinte concentração em PBS: 2500 µg/mL, sendo suas concentrações finais na reação: 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, e 500 µg/mL.

Para a realização dos testes adicionou-se a placa de leitura : tampão PBS suplementado, luminol (1×10^{-5} M), suspensão celular de eosinófilos (5×10^6 células/mm³), o óleo em diferentes concentrações e zymozan opsonizado. O tempo de reação foi de 30 minutos (KITAGAWA *et al.*, 2003; GALICE *et al.*, 2006).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados por análise de variância (Anova) seguido de teste-t de Student onde foi estabelecido o nível de significância de p<0,05. Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata.

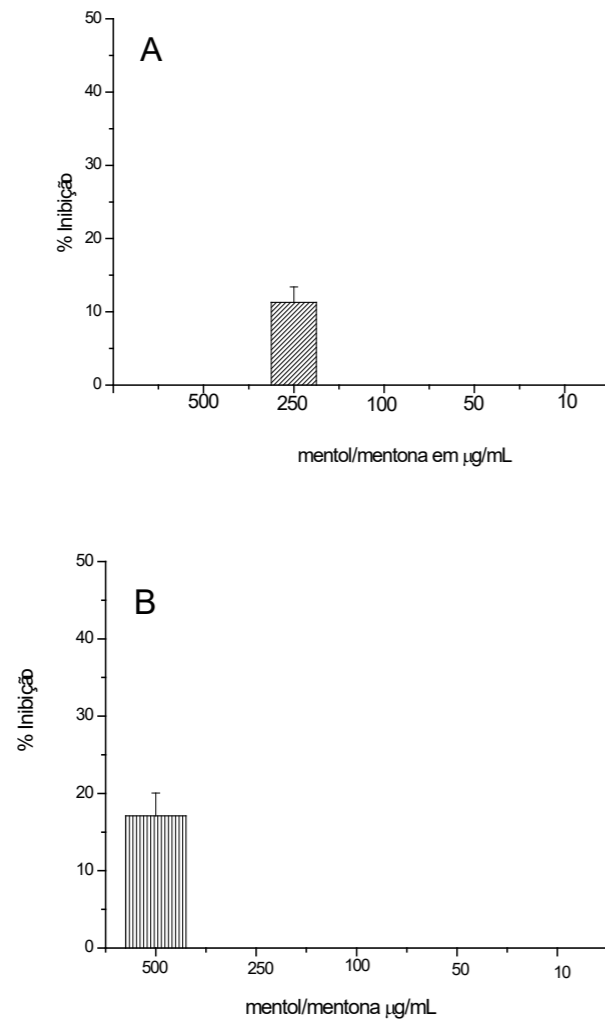
RESULTADOS

Avaliação do Efeito supressor do fitofármaco em neutrófilos e eosinófilos

Substâncias antioxidantes são compostos que atuam inibindo ou diminuindo os efeitos provocados pelas substâncias oxidantes ou radicais livres, neste caso estamos avaliando o potencial antioxidante da mistura mentol/mistura na inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Com relação à quimiluminescência do luminol, não observamos inibição da produção de ERO pelo fitofármaco, pois a inibição encontrada em uma única concentração foi pequena (**Figura 01A e 01B**).

O efeito supressor do fitofármaco, sobre o “burst” oxidativo dos neutrófilos humanos e eosinófilos de camundongos e conseqüentemente, sobre a produção das ERO, está demonstrado nas **Figura 01A e 01B**. Somente nas maiores concentrações de 250 e 500 µM ocorreu uma pequena inibição (11,3 e 16,8% respectivamente) nos EROS. No entanto, como esta inibição foi pequena e ocorreu somente em uma concentração, podemos dizer que foi irrelevante.

Figura 01 - Efeito do fitofármaco contendo a mistura mentol/mentona em diferentes concentrações sobre a inibição da produção de EROs no “burst” oxidativo de (A) neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado e (B) eosinófilos estimulados por zymozan opsonizado (estudo da quimiluminescência do luminol- QLDLum).

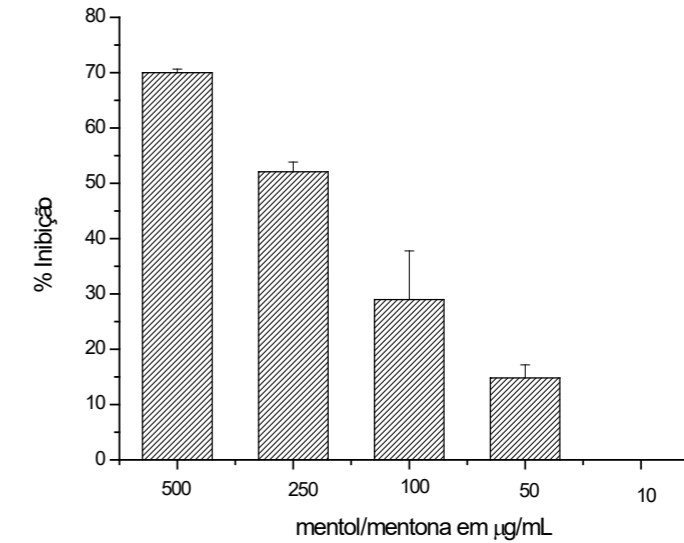


EFEITO SUPRESSOR DO FITOFÁRMACO EM NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS POR ZYMOZAN

Com relação à supressão da produção de radical ânion superóxido os resultados estão demonstrados na **Figura 02**, e com exceção da concentração de 10 µM, todas as outras inibiram a produção do ânion superóxido pelo ensaio com a lucigenina e a inibição foi dependente da concentração do fitofármaco (inibição de 70% com a concentração de 500 µM).

O efeito inibitório pode ser sobre o sistema NADPH oxidase de membrana ou uma ação “scavenger” para o ânion superóxido. A quimiluminescência dependente da lucigenina (QLDLuc) tem sido usada em sistemas biológicos como uma avaliação de eventos extracelulares, pela detecção do radical ânion superóxido, sendo um método de escolha na avaliação do funcionamento do sistema NADPH oxidase de membrana.

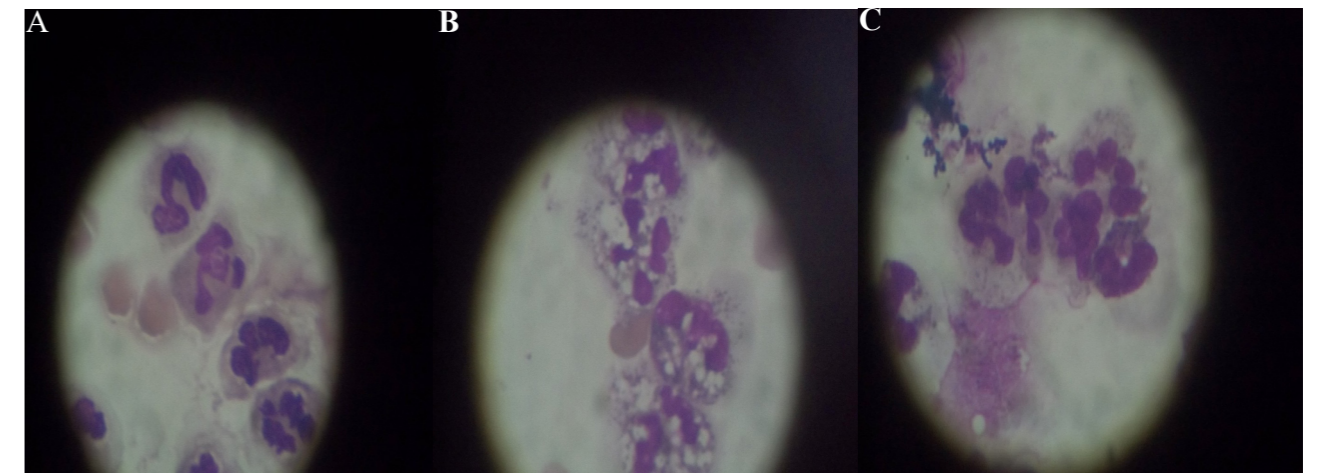
Figura 02 - Efeito do fitofármaco contendo a mistura mentol/mentona em diferentes concentrações sobre a inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado (estudo da quimiluminescência da lucigenina - QLDLuc).



LEUCOTOXICIDADE (ESTUDO MORFOLÓGICO)

A **Figura 03** demonstra as fotomicrografias dos neutrófilos na presença do estímulo da fagocitose o PMA, e a consequente formação de vacúolo devido sua presença (controle positivo). Neste ensaio podemos observar a proteção do fitofármaco contendo a mistura mentol/mentona frente ao estímulo PMA, está proteção esteve presente em todas as concentrações, mas com maior evidência nas concentrações de 10 e 50 µM.

Figura 03 - Fotomicrografia da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação do PMA e proteção exercida pelo fitofármaco. **A**: controle negativo (células sem a presença do estímulo PMA). **B**: controle positivo (células + PMA). **C**: neutrófilos ativados por PMA sob ação do fitofármaco 10 µM. Coloração: May-Grunwald-Giemsa. Aumento 1000x.



AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOFÁRMACO NO SISTEMA MPO/H₂O₂ - ENSAIO COM TMB

A Tabela 01 demonstra o ensaio de avaliação de atividade da mieloperoxidase pela oxidação do TMB, na ausência e presença do fitofármaco contendo a mistura mentol/mentona em diferentes concentrações. Não observamos diferenças significativas entre o grupo sem o composto e na presença do composto, portanto não ocorreu inibição da enzima. Portanto, provavelmente, seu efeito deva ser mais em nível de membrana celular.

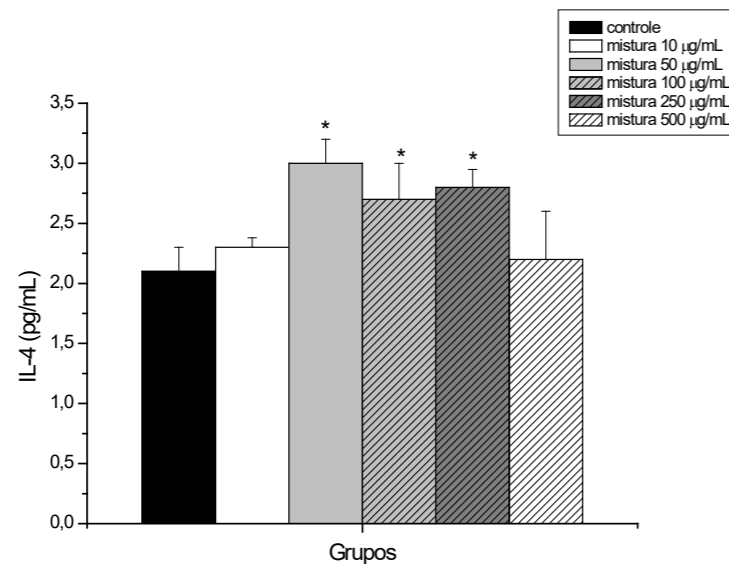
Tabela 01 - Atividade da enzima MPO analisada pelo ensaio com TMB (pH 5,4) na ausência e presença fitofármaco diferentes concentrações.

Grupos	Δ A 652/min	Unidades/mL
Sistema Completo	0,05 ± 0,0028	0,255 ± 0,02
+ Mentaliv® 10 µg/mL	0,046 ± 0,0028	0,23 ± 0,01
+ Mentaliv® 50 µg/mL	0,054 ± 0,0028	0,275 ± 0,02
+ Mentaliv® 100 µg/mL	0,0486 ± 0,0037	0,245 ± 0,02
+ Mentol 250 µg/mL	0,0525 ± 0,0057	0,27 ± 0,03
+ Mentaliv® 500 µg/mL	0,04 ± 0,0076	0,2 ± 0,04

DETECÇÃO DE IL-4, IL-6 E TNF-ALFA EM CULTURA DE EOSINÓFILOS NA PRESENÇA DO FITOFÁRMACO.

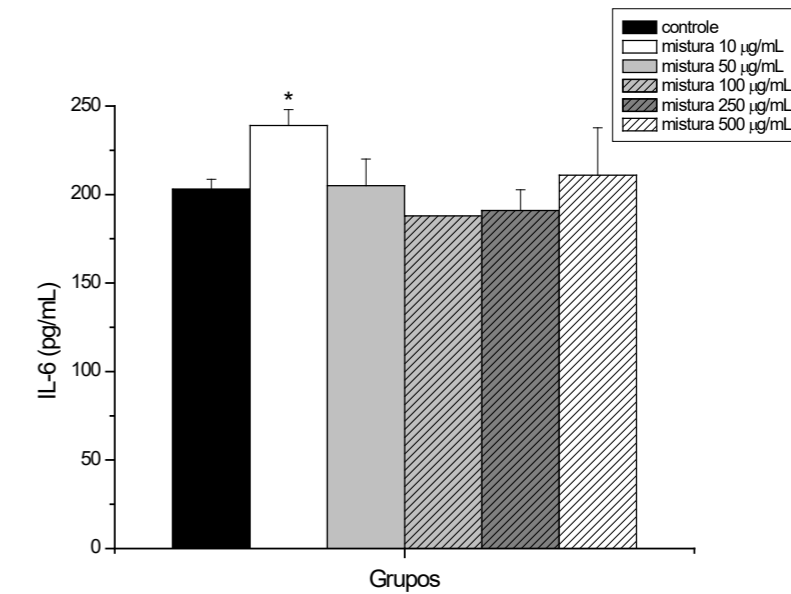
Como apresentado nas Figuras 04, 05 e 06, observamos que pelo menos em uma concentração do fitofármaco ocorreu aumento na liberação das citocinas estudadas, no entanto o resultado ficou mais evidente com a IL-4 onde com as concentrações de fitofármaco 50, 100 e 250 µg/mL a liberação desta citocina foi significativamente maior. E o mesmo ocorreu para secreção de TNF-α na concentração de 250 µg/mL.

Figura 04 - Liberação de IL-4 de eosinófilos, incubados com fitofármaco contendo mentol/ mentona em diferentes concentrações.



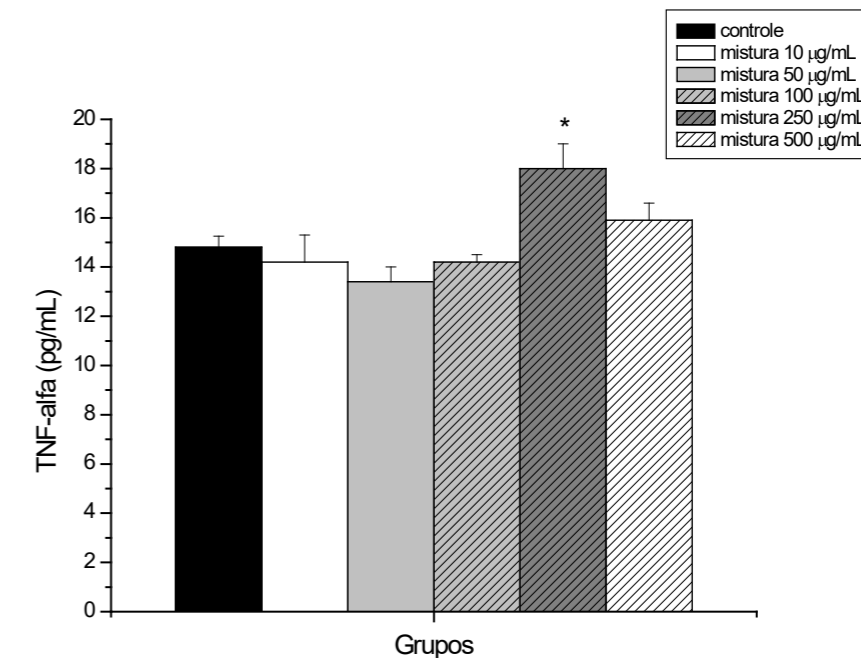
*p<0,05 quando comparado ao sistema completo na ausência da mistura mentol/mentona.

Figura 05 - Liberação de IL-6 de eosinófilos, incubados com fitofármaco contendo mentol/ mentona em diferentes concentrações.



*p<0,05 quando comparado ao sistema completo na ausência da mistura mentol/mentona.

Figura 06 - Liberação de TNF-alfa de eosinófilos, incubados com fitofármaco contendo mentol/ mentona em diferentes concentrações.



*p<0,05 quando comparado ao sistema completo na ausência da mistura mentol/mentona.

DISCUSSÃO

A reação inflamatória é uma resposta do organismo contra agentes agressores, caracteriza-se pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, pela migração de células inflamatórias como neutrófilos, de forma muito significativa eosinófilos, macrófagos e linfócitos. O mecanismo responsável pelo acúmulo destas células no foco inflamatório é um fenômeno complexo que depende da natureza do estímulo, dos mediadores quimiotáticos liberados, da expressão de moléculas de adesão e das células residentes (mononucleares e mastócitos) no microambiente (HOGAN *et al.*, 2008).

Há muito tempo, foi descoberto que neutrófilos durante o processo fagocitário consomem oxigênio (IYER *et al.*, 1961) que é protagonizado por um complexo enzimático conhecido como NADPH oxidase de membrana. Os eosinófilos também podem realizar “burst” respiratório com formação de radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, assim como os neutrófilos, em resposta a estímulos particulados como o zymozan ou em resposta a mediadores solúveis como o forbol miristato acetato (PMA). Em ensaio de quimiluminescência, os eosinófilos mostraram uma emissão de luz duas vezes maior do que o mesmo experimento na presença de neutrófilos (WILLIAMS *et al.*, 2001).

Ambos, o mentol e a mentona presentes em abundância na *M. piperita* são conhecidos como terpenos, formam uma subdivisão de classe dos prenol-lipídios (terpenos, prenolquinonas, e esteróis), os quais são o grupo mais antigo de pequenas moléculas sintetizadas por plantas. E o mentol é considerado o terpeno com aplicação farmacêutica mais conhecida (MARINHO, 2008). Quanto a estudos de absorção em membranas, compostos naturais como terpenos são considerados moléculas promissoras em estudos com aplicações farmacêuticas como promotores de absorção, devido a baixa toxicidade e habilidade em aumentar a permeabilidade de moléculas tanto hidrofílicas quanto lipofílicas (ASBIN; MICHNIAK, 2000). A investigação de produtos naturais como fontes de novos agentes terapêuticos é de grande interesse científico e social devido à falta de um medicamento com baixa capacidade de induzir reações adversas. Os trabalhos anteriores com o extrato da *M. piperita* e os questionamentos quanto aos interferentes quanto aos constituintes da planta devido ao seu plantio, coleta e solo, nos levaram a objetivar trabalhar com os constituintes químicos da planta separadamente. Por isso, o entendimento específico da reação inflamatória e seus possíveis interferentes nos levaram a avaliar a ação do mentol e da mentona proveniente de um fitofármaco sobre a função de neutrófilos e eosinófilos *in vitro*.

Para o estudos dos neutrófilos vale-se analisar principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio, indiretamente sobre a NADPH oxidase de membrana quando estudamos o “burst” oxidativo com a lucigenina. E ainda determinar a produção de radical ânion superóxido e a atividade da mieloperoxidase nessas células *ex vivo*. E devido ao eosinófilos ser uma importante célula que contribui para a imunidade efetora, avaliar os efeitos desses compostos mentol e mentona contribui para uma maior entendimento de como esses compostos poderão modular a resposta inflamatória em diferentes doenças.

Allen (2000) demonstrou que a oxidação do luminol pode ocorrer tanto pelo sistema MPO/H₂O₂ como devido à reação luminol/HOCl com a formação de uma diazoquinona que posteriormente reage com H₂O₂ formando aminofalato eletronicamente excitado, que ao voltar para o estado fundamental emite luz. DalgrenKarlson (1999) mostraram que a QLDLum produzida por neutrófilos estimulados depende em grande parte da geração de HOCl pelo sistema MPO/H₂O₂/Cl⁻. A mistura mentol/mentona inibiu a QLDLum dos neutrófilos somente em uma concentração, o teste foi realizado também com eosinófilos de ratos e resultado semelhante foi obtido (**Figura 01 A e 01B**). A partir destes resultados e conhecendo as substâncias formadas durante o “burst” respiratório, pudemos realizar algumas indagações que nortearam nossos experimentos na tentativa de se elucidar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) no processo: A produção das espécies reativas de oxigênio, envolvidas direta (H₂O₂ e HOCl) e indiretamente (O₂⁻) na

oxidação do luminol estaria prejudicada? Nesse caso, a mistura mentol/mentona estaria agindo sobre a mieloperoxidase e /ou sobre a NADPH oxidase de membrana? Por isso, foi investigado a interferência desse fitofármaco na mieloperoxidase (MPO).

Ao determinar a ação desse fitofármaco sobre a MPO através de experimento com a TMB que é muito mais sensível (MARQUEZ; DUNFORD, 1998), ficou claro no experimento com a TMB, que o mesmo não funciona como inibidor da MPO (**Tabela 01**), sugerindo que a *M. piperita* não interfere na MPO, como consequência não interfere na eficiência de uma das vias do “burst” oxidativo dos neutrófilos.

Assim, o efeito do fitofármaco foi determinado sobre a NADPH-oxidase de membrana e sobre o seu produto, o radical ânion superóxido. O termo “burst” respiratório ou “burst” oxidativo, refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem quando os fagócitos são estimulados apropriadamente. Estes são: aumento de consumo de O₂ e produção de espécies reativas de oxigênio (CHANOCK *et al.*, 1994; SEGAL ; ABO, 1993). Todos esses eventos dependem da atividade de um sistema complexo denominado NADPH-oxidase de membrana. A NADPH-oxidase é um complexo protéico que se reúne em resposta a um sinal que ativa o neutrófilo. O bom funcionamento da NADPH-oxidase é essencial numa adequada defesa antimicrobiana. Neutrófilos de pacientes com doença granulomatosa crônica, que é uma doença caracterizada pela deficiência da NADPH-oxidase de membrana, têm dificuldade de destruir muitos microrganismos (bactérias, fungos etc) e indivíduos com esta doença têm severas infecções (CHANOCK *et al.*, 1994; SEGAL ; ABO, 1993). A mistura mentol/mentona inibiu a quimiluminescência dependente da lucigenina (QLDLuc) sugerindo uma inibição da produção do radical ânion superóxido e possivelmente da NADPH oxidase de membrana.

Realizamos também um ensaio de leucotoxicidade, ou também chamado estudo morfológico. Como demonstrado em outro estudo, o PMA, um estimulador do “burst” oxidativo dos neutrófilos, mesmo sem adicionar nenhuma outra substância, é capaz de causar a formação de microvacúolos citoplasmáticos, ativados pela liberação maciça de ERO e consequente dano a estrutura destas células (HOLDAR *et al.*, 1978). Assim, foi avaliado o efeito do fitofármaco na proteção da estrutura dos neutrófilos, pois trabalhos com outras membranas demonstram que substâncias como os terpenos são interessantes, pois têm afinidades tanto por estruturas hidrofílicas como lipofílicas (ASBIN; MICHNIAK, 2000). Foi observado em todas as concentrações uma diminuição do número de vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos estimulados, ou seja a mistura foi capaz de inibir a formação de ERO, provavelmente por inibição da NADPH oxidase de membrana, uma vez que não é inibidora da mieloperoxidase.

A inflamação tecidual e o quadro de fibrose está diretamente relacionado às espécies reativas de oxigênio que estão sendo formadas localmente pelos leucócitos, principalmente eosinófilos, que podem secretar IL-13 contribuindo com a fibrose hepática em diferentes doenças. Os neutrófilos também desempenham uma importante função no sistema imunológico, como célula produtora de citocinas (CASSATELA, 1995). A citocina liberada em maior quantidade pelos neutrófilos é a IL-8, que é o maior quimioatraente para os neutrófilos, sugerindo que, uma vez localizado no sítio inflamatório, eles podem promover posteriormente um maior recrutamento de neutrófilos para o local (CASSATELA, 1995). As células mononucleares produzem mais citocinas do que os neutrófilos, no entanto os granulócitos constituem a maioria das células infiltradas nos tecidos inflamados e podem representar uma importante fonte de citocinas nos tecidos (CASSATELLA, 1995).

Alguns trabalhos estudaram a ação de antioxidantes sobre a liberação de IL-8 e demonstraram

Os eosinófilos são capazes de promover também proliferação e ativação Th1/Th2 de células T através da secreção de várias citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12) (KITA, 1996, SHI *et al.*, 2000, MACKENZIE *et al.*, 2001, ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Foi avaliado a liberação de IL-4, IL-6

e TNF- α de eosinófilos na presença da mistura mentol/mentona e verificamos que os resultados foram mais expressivos com relação a liberação de IL-4 (**Figura 04**), em três concentrações estudadas, ocorreu um aumento significativo na liberação da citocina. O TNF- α também tem um papel crucial durante a resposta inflamatória, e estudos demonstram que o TNF- α atua como uma citocina inflamatória inicial que subsequentemente regula tanto a infiltração precoce de neutrófilos como o recrutamento de eosinófilos (LUKACS, et al 1995). E nossos dados, demonstraram que na presença do fitoterápico a liberação de TNF- α foi maior, principalmente nas concentrações mais altas. Dessa forma pode-se sugerir que, esses compostos presentes no fitofármaco podem contribuir com a diminuição formação da fibrose hepática, onde a presença da *M. piperita*, modulou os eosinófilos envolvidos formação dos granulomas e no controle de recrutamento de diferentes células inflamatórias para esse sítio de inflamação (KITA, 2013, DEJANI et al., 2014).

Analisando os resultados do presente trabalho, percebe-se que os compostos presentes no fitofármaco não atua de forma inibidora para mieloperoxidase, portanto não interferiu em uma das vias do “burst” oxidativo dos neutrófilos. Entretanto, inibiu a produção de radical ânion superóxido e possivelmente a NADPH oxidase de membrana, o que também foi observado no estudo morfológico. Foi demonstrado também o efeito hipoglicêmico através de estudos com o decocto aquoso da *Bauhinia. Forficata* e potencial antioxidante do flavonóide Kaempferitrina, sendo confirmado o potencial contra diabetes com extrato aquoso (SOUZA, 2004; PEPATO, 2004; MENEZES, 2007).

A *M. piperita* apresenta-se com um possível anti-inflamatório, e inibiu a formação de fibrose hepática (dados não mostrados), provavelmente por inibição de formação de EROs, e ainda estimulou maior liberação de citocinas pelos eosinófilos na presença da mistura mentol/mentona, o que pode auxiliar na resposta imunológica e no processo inflamatório em diferentes doenças com perfil de eosinofilia sistêmica.

CONCLUSÕES

O fitofármaco, obtido a partir do óleo comercial extraído da *Mentha piperita* demonstrou atividade antioxidante, especialmente como inibidor da NADPH-oxidase tanto pelo ensaio de quimiluminescência da lucigenina, como por meio da análise morfológica. Como inibidora das demais espécies reativas de oxigênio não foi observado efeito no ensaio de quimiluminescência com o luminol, nem com neutrófilos humanos e nem com eosinófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos. Não se observou inibição da enzima mieloperoxidase de neutrófilos pelo ensaio com TMB. O fitofármaco parece contribuir com o aumento dos níveis de IL-4 e TNF- α pelos eosinófilos. E assim, nossos resultados sugerem que esse fitofármaco apresenta atividade anti-inflamatória, por meio do controle dos produtos secretados durante as reações inflamatórias, principalmente durante a infecção crônica, onde se observa uma acentuada eosinofilia tecidual, com presença significativa de PMN.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, K. K.; KHANUJA, S. P. S.; AHMAD, A. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*. V. 17, p. 59-63, 2002.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal Ethnopharmacol.*v. 73, p. 113-123, 2001. [PubMed]

ALLEN, R. C. *Haloperoxidase acid optimum chemiluminescence assay system*. In: ALLEN, R. C.;

DALE, D. C.; TAYLOR, J. R. F. B. *Blood phagocyte luminescence: gauging systemic immune activation: Methods Enzymol.*v. 305, p. 591-609, 2000.

ALVES, C. M. O. S.; MARZOCHI-MACHADO, C. M.; CARVALHO, I. F.; VALIM, Y. M. L. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcy and complement receptors instimulating the oxidative burst in neutrophils. *Talanta*.v. 60, p. 601-8, 2003.

AMR, E. E.; EMAN, S. F. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Food / Nahrung*. V.42, n. 2, p.117-121, April 2003.[PubMed]

ANSARI, M. A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M.; RAZDAN, R. K. *Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (Mentha piperita) oil*. *Bioresource Technology*, v. 71, n. 3, p. 267-271, Febr.2000. [Link]

ARAÚJO, N.; KÖHN, A.; KATZ, N. Therapeutic evaluation of artesunate in experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* . v. 32, p. 7-12, 1999.

ASBIN, C. S.; MICHINIYAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *PSTT*, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000. [PubMed]

BANDEIRA-MELO, C.; SUGIYAMA, K.; WOODS, L. J.; WELLER, P. F. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol*. V. 166, n. 8, p.4813-7,2001.[PubMed]

BARBERATO, S. N. **Novos derivados da oximiquina potencialmente esquitossomicidas**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo. 1996.

BARR, S.; HILL, E. W.; BAYAT, A. Development, fabrication and evaluation of a novel biomimetic human breast tissue derived breast implant surface. *Acta Biomater.*v. 49, p. 260-271, Feb. 2017.[CrossRef] [PubMed]

BRITO, A. M. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Tiradentes –Aracajú. Novembro, 2007.

BROADDUS, V. C.; BOYLAN, A. M.; HOFFEL, J. M.; KIM, K. J.; SADICK, M.; CHUNTHARAPAI, A.; HÉBERT, C. A. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy.. *The Journal of Immunology*, v. 152, n. 6, p. 2960-2967, 1994.[Link]

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. v. 94, n.3, p. 223-253, Aug.2004.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils, 16. *P*. 16-21, 1995.

CASTRO, et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quím. Nova**, v.30, n. 7, São Paulo, 2007.

CHANOCK, S. J.; BENNA, J.; SMITH, R. M.; BABIOR, B. M. The respiratory burst oxidase. **J. Biol. Chem.** V. 269, p. 24519-24522, 1994. [PubMed]

CHITSULO, L.; ENGELS, D., MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop** v.77, p.77, 2000. [PubMed]

CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Biotransformations of terpenes. **Biotechnology Advance**, v. 24, n. 2, p. 134-142, 2006.

DEJANI, N. N.; SOUZA, L. C.; OLIVEIRA, S. R.; NERIS, D. M.; RODOLPHO, J. M.; CORREIA, R. O.; RODRIGUES, V.; SACRAMENTO, L. V.; FACCIOLI, L. H.; AFONSO, A.; ANIBAL, F. F. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha x piperita* L. **Immunobiology**. V. 219, n. 8, p. 627-32, Aug.2014. [CrossRef]

DINIS, P. **Atividade biológica de extractos aquosos de *Mentha sp.***: perfil antioxidante, anticariogénico e metabolização digestiva *in vitro*. Dissertação (Mestrado), 2010.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B. R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. **J. Immunol. Methods**, v. 5, p. 249-252, 1974. [PubMed]

FAULKNER, K.; FRIDOLVICH, I. Luminol and lucigenin as detectors for superoxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 15, p. 447-451, 1993.

FERRANT, A.; HAUPTMANN, B.; SECKINGER, P.; DAYER, J. M. Inhibition of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced neutrophil respiratory burst by a TNF inhibitor. **Immunology**, v. 72, n. 3, 440-442, March. 1991.

GALICE, D. M.; BONACORSI, C.; SOARES, V. C. G.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression., v. 28, p. 143-146, 2006.

GASPARINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; NOTASHIS, S. D.; SIMONCINI, M.; CAVALLARI, A.; RODA, E.; BERNARDI, M.; RODA, A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. **Free Radic Biol Med**. v. 15, p. 211-16, 1998.

GROSS, V.; ANDRESEN, R.; LESER, H. G.; CESKA, M.; LIEHL, E.; LAUSEN, M.; FARTHMAN, E. H.; SCHÖLMERICH, J. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 22, n.3, p. 200-203, 1992. [CrossRef]

GONÇALVES, R. S.; BATTISTIN, A., PAULETTI, G.; ROTA, L.; SERAFINI, L. A. Antioxidant properties of essential oils from *Mentha* species evidenced by electrochemical methods. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu. v. 11, n.4, p. 372-82, 2009. [Link]

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood.**, v. 92, p. 3007-17, 1998. [PubMed.]

HOLDAR, J.; REPINE, J. E.; BEALL, G. D.; RASP, J. R. F. L.; WHITE, J. B. The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages. **Am. J. Pathol.**, v. 91, p. 469-82. 1978.

HOGAN, S. P.; ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S.; LACY, P.; KAY, A. B.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 28, n.5, p. 709-50, 2008. [CrossRef]

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K. H. C. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. **J. Agric. Food Chem**. v.5, p. 3943-46, 2002. [CrossRef] [PubMed]

IYER, G. Y. N.; NAIR, M. S.; SUKUMARAN, M. Biochemical aspects of phagocytosis. **Nature**. v. 192, p. 535-44, 1961.

KITA, H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *The Journal of allergy and clinical immunology*. 97, n.4, p. 889-92, 1996. [CrossRef]

KITA, H. Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. **International archives of allergy and immunology**. , v. 161, Suppl 2, p. 3-9, 2013. [PubMed]

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the Isocoumarin Paepalntine on the Luminol and the Lucigenin Amplified Chemiluminescence of Rat Neutrophils. **Biol Pharm Bull.**, v. 26, n.6, p. 905-908, 2003.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; LEITE, S.; XAVIER, A. L.; MEDEIROS, I. A. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.19, n.4, p. : 842-846, Out./Dez.2009

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum. 2002.

LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. W.; WIDMER, M.; KUNKEL, S. L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. **J. Immunol.** v.154, n.10, p. 5411-5417, 1995.

MARINHO, R. O. S. **Estudo Fitoquímico da Espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em**

dermocosmética. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 100f, 2008.

MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B. Mechanism of the oxidation of 3, 5, 3', 5'- tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determine by transient- and steady-state kinetics. **Biochemistry.** v. 36, p. 9349-55, 1997. [PubMed]

MCCOLL, S. R.; PAQUIN, R.; MÉNARD, C.; BEAULIEU, A. D. Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. **JEM., v. 176, n. 2, p. 593-98, 1992.** [CrossRef]

MACKENZIE, J. R.; MATTES, J.; DENT, L. A.; FOSTER, P. S. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. **J Immunol.** v. 167, n.6, p.3146- 55, 2001. [PubMed]

MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A. Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? **Trends in Parasitology.** v. 16, n.3, p. 95-101, 2000. [CrossRef]

MELO, R. C. N.; SPENCER, L. A.; PEREZ, S. A.; NEVES, J. S.; BAFFORD, S. P.; MORGAN, E. S. Vesiclemediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. Laboratory investigation; **Journal of technical Methods and Pathology.**v.89, n.7, p. 769-81, 2009 [CrossRef]

NASCIMENTO, G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.,** v. 31. Oct 2000.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual review of immunology.** v. 24, p.147-74, 2006.. [PubMed]

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.**v.35, p. 275-280, 2004. [CrossRef]

SCAVRONI, J.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M.; FERREIRA, L. C. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) grown with biosolid. **Brazilian Journal of Plant Physiology.**v. 17, n.4, p. 345-52, 2005.

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem. Sci.**v. 18, p. 43-47, 1993. [CrossRef]

SCHUHMACHER, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. **Phytomedicine.**v.10, n.6-7, p. 504-510, 2003. [PubMed]

SHI, H. Z.; HUMBLE, A.; GERARD, C.; JIN, Z.; WELLER, P. F. Lymph node trafficking and antigen

presentation by endobronchial eosinophils. **The Journal of clinical investigation.** v. 105, 7):945-53, 2000.

SPASOJEVIC, I.; LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. Lucigenin: Redox potencial in aqueous media and redox cycling O₂- production. **Arch. Biochem. Biophys.,** v.373, p. 447-50, 2000.

SPEIRS, R.; DREISBACH, M. E. Quantitative studies of the cellular responses to antigen injections in normal mice. Technic for determining cells in the peritoneal fluid. R. B. Jackson Memorial Library, Bar Harbor, **Maine,** v.3, augus 1955.

TOBLER, A.; KOEFFLER, P. Myeloperoxidase ructure, and function. Cell Biochemistry. New York and London: **Plenun Press.**v.3, n. 10, p.255-87, 1991.

VERHOC, J.; VISSER, M. R. Neutrophil phagocytosis and killing normal functions and microbial evasion. The neutrophil, IRL Press, Oxford, 1993. p. 110.

VIDAL, F.; GADELHA, A. P. R.; LOPES, C. S.; COELHO, M. G. P.; MONTEIRO-LEAL, L. H. Giardia lamblia: the effects of extracts and fractions from Mentha x piperita Lin., (Lamiaceae) on trophozoites, **Experimental Parasitology,** v. 115, p. 25-31, 2007.

WILLIAMS, J. E; BEUTLER, E. ; COLLER, B. S., LICHTMAN, M. A., KIPPS, T. J., SELIGSOHN, U. **Hematology.** 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

ZHELJAZKOV, V. D; CANTRELL, C. L; ASATKIE, T. Yield, Content, and Composition of Peppermint and Spearmints as a Function of Harvesting Time and Drying. **J. Agric. Food Chem.**v. 58, p. 11400-11407, 2010. [Link]