

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NOA DUTKEVICZ

**PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA INIBIÇÃO DA
MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO EXTRATO BRUTO DA *Cunila spicata*
EM CAMUNDONGOS**

REALEZA

2024

NOA DUTKEVICZ

**PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA INIBIÇÃO DA
MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO EXTRATO BRUTO DA *Cunila spicata*
EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Schlemper

REALEZA

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Dutkevicz, Noa

PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA
INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO EXTRATO BRUTO
DA *Cunila spicata* / Noa Dutkevicz. -- 2024.

44 f.:il.

Orientador: Valfredo Schlemper Prof Dr

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. Medicina Veterinária. 2. Farmacologia. 3.
Fitoterapia. I. Dr, Prof, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NOA DUTKEVICZ

**PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA INIBIÇÃO DA
MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO EXTRATO BRUTO DA *Cunila spicata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médico Veterinário

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 25/10/2014.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **VALFREDO SCHLEMPER**
Data: 26/11/2024 11:53:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Valfredo Schlemper – UFFS
Orientador

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINE BALDESSAR DAL MOLIN**
Data: 25/11/2024 12:19:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ms. Caroline Baldessar Dal Molin - UFFS
Avaliadora

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANA PEREIRA MACHADO**
Data: 22/11/2024 18:46:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Luciana Pereira Machado– UFFS
Avaliadora

27° 7' 51.8016" S 52° 36' 14.5836" W

Time will pass anyways.

“You already know the story. You will die. Everyone you love will also die. You will lose them forever. You will be sad and angry. You will weep. You will bargain. You will make demands. You will beg. You will pray. It will make no difference. Nothing you can do will bring them back. You know this. Your knowing changes nothing. This poem will make you understand this unfathomable truth again and again, as if for the very first time.” Introduction to *The Iliad*, Emily Wilson, 2023.

RESUMO

O sistema respiratório (SR) é afetado por doenças e condições de diferentes etiologias, cada qual envolvendo inúmeros mediadores, vias bioquímicas e imunológicas. Diversos modelos animais foram desenvolvidos para estudo e pesquisa de alterações agudas do SR, como a inalação de um agente flogístico em camundongos. A carragenina é um polissacarídeo capaz de induzir resposta inflamatória aguda com liberação não seletiva de mediadores inflamatórios. A *Cunila spicata* é uma planta fitoterápica que faz parte da seção Spicatae, família Lamiaceae, nativa da região Sul da América Latina, também conhecida como poejo do campo. Possui forte presença na etnofarmacologia, sendo utilizada para tratar doenças do sistema digestivo e respiratório, como enjoos, diarreias, enjoos, rinites, tosse, bronquite, gripes e possui ação expectorante. A análise fitoquímica da *C. spicata* colhida no município no planalto Catarinense revelou 2-Bornanona e Mentofurano em maior quantidade. A planta seca foi submetida à extração assistida por ultrassom (30min, amplitude 65% e ciclo de 1,0) e rotaevaporador (70°C à 100 RPM), e o material seco em estufa, acondicionado em frasco âmbar e congelado até o uso, momento o qual foi ressuspensionado em DMSO 5% e diluído com PBS na concentração desejada. O lavado broncoalveolar (BAL) permite a avaliação dos fenômenos inflamatórios locais do SR a partir de diferentes técnicas, como a contagem total de leucócitos (CTL) e contagem diferencial de leucócitos (CDL). O presente trabalho analisou a CTL e CDL de camundongos Balb/C pré-tratados com diferentes doses do extrato hidroalcoólico da *C. spicata* (EHCS) (30mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg), meloxicam (controle positivo (CP) (2mg/kg)) e PBS (controle negativo (CN)) V.O por gavagem uma hora posterior à nebulização com carragenina (300µg/ml) durante 3 minutos. Após 2hr, os animais foram eutanasiados, o BAL foi realizado com 2ml de PBS heparinizado e as amostras foram centrifugadas por 5min a 2000 RPM. O sobrenadante foi reservado para análises posteriores e os pellets ressuspensionados em 1,0ml de PBS, da qual 100µl foi adicionado à 100µl de líquido de Turk e utilizado na CTL a partir da câmara de Neubauer com objetiva de 40x. O restante foi para a CDL, com a sedimentação celular na câmara de Suta, sendo utilizado somente o suficiente para preencher o orifício do papel filtro e submetido a secagem em estufa a 30°C, sendo corados com panóptico simples rápido e contado até 200 células por lâmina com a lente objetiva de imersão (aumento de 1000x). Foi observado um aumento significativo no recrutamento de leucócitos totais nos pulmões dos animais submetidos à nebulização com carragenina. O EHCS reduziu de maneira significativa e dose-dependente a migração de leucócitos totais no BAL de camundongos submetidos à nebulização por carragenina. As inibições máximas obtidas foram de $49,84 \pm$

5,35%, $61,66 \pm 4,55\%$ e $75,30 \pm 2,86\%$ para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. As células encontradas em maior número foram as mononucleares, macrófagos e linfócitos. Não foram observados sinais de toxicidade no período e nas doses utilizadas durante o experimento. O EHCS possui potencial produto fitoterápico na inflamação das vias aéreas.

Palavras-chave: Inflamação; vias aéreas; poejeinho; fitoterapia; influxo celular.

ABSTRACT

The respiratory system (RS) is affected by diseases of different etiologies, involving many mediators, biochemical and immunological pathways. Several animal models have been developed for researching and studying acute RS inflammation, such as phlogistic agent inhalation in mice. Carrageenan is a polysaccharide capable of inducing an acute inflammatory response with non-selective inflammatory mediators' release. *Cunila spicata* is a phytotherapeutic plant that is part of the Spicatae section, Lamiaceae family, native to the southern region of Latin America, also known as pennyroyal. It has a strong presence in ethnopharmacology and it is used to treat digestive and respiratory systems conditions, such as nausea, diarrhea, nausea, rhinitis, coughs, bronchitis, flu and it has expectorant action. A phytochemical analysis of *C. spicata* collected in Santa Catarina revealed 2-Bornanone and Menthofurane in greater quantities. The dried plant was subjected to ultrasound-assisted cleaning (30 min, amplitude 65% and cycle 1.0) followed by rotary evaporator (70°C at 100 RPM), and then the material was oven dried, stored in an amber bottle and frozen until use, at which time it was resuspended in 5% DMSO and diluted with PBS to desired concentration. Bronchoalveolar lavage (BAL) allows the evaluation of local inflammatory characteristics of RS using different techniques, such as total leukocyte count (TLC) and differential leukocyte count (DLC). The present study analyzed CTL and CDL of Balb/C mice pretreated with different doses of the hydroalcoholic extract of *C. spicata* (HECS) (30mg/kg, 100mg/kg and 300mg/kg), meloxicam (positive control (CP) (2mg/kg)) and PBS (negative control (CN)) V.O by gavage one hour after nebulization with carrageenan (300µg/ml) for 3 minutes. After 2h, the animals were euthanized, BAL was performed with 2ml of heparinized PBS and samples centrifuged for 5min at 2000 RPM. The supernatant was reserved for posterior analysis and the pellets resuspended in 1.0 ml of PBS, of which 100 µl was added to 100 µl of Turk's liquid and used in the CTL from the Neubauer chamber with a 40x objective. The remainder was used for the CDL, with cell sedimentation in the Suta chamber, using only enough to fill the opening of the filter paper and requested to be conducted in an oven at 30°C, being stained with a quick panopticon dye and counted up to 200 cells per slide using the 1000x objective microscope lens. A significant increase in the recruitment of total leukocytes in the lungs of animals subjected to nebulization with carrageenan was observed. EHCS significantly and dose-dependently prevents the migration of total leukocytes in the BAL of mice subjected to nebulization with carrageenan. The maximum inhibitions obtained were $49.84 \pm 5.35\%$, $61.66 \pm 4.55\%$ and $75.30 \pm 2.86\%$ for the doses of 30, 100 and 300 mg/kg, respectively. The cells

found in greater numbers were mononuclear cells, macrophages and lymphocytes. No signs of toxicity were transmitted during the period and at the doses used during the experiment. EHCS has potential as a phytotherapeutic product in airway inflammation.

Keywords: Inflammation; airways; pennyroyal; phytotherapy; cellular influx.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>C. spicata</i> jovem e em floração.	22
Figura 2 – Camundongos Balb/C na câmara de nebulização.	24
Gráfico 1 - Efeito inibitório médio do EHCS V.O e do meloxicam sobre a migração de células inflamatórias totais no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C.....	27
Gráfico 2 - Efeito inibitório do EHCS V.O e meloxicam V.O. sobre a migração de macrófagos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C	29
Figura 3 – Macrófagos e linfócitos no BAL.	29
Gráfico 3 - Efeito inibitório do EHCS V.O sobre a migração de linfócitos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C,.....	30
Figura 4 – Linfócitos no BAL.....	30
Gráfico 4 - Efeito inibitório do EHCS V.O e meloxicam V.O. sobre a migração de neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C.	31
Figura 5 – Neutrófilos no BAL.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da contagem diferencial de leucócitos do lavado broncoalveolar de camundongos submetidos a nebulização por carragenina.	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Lavado Broncoalveolar
CDL	Contagem diferencial de leucócitos
CN	Controle negativo
COX	Cicloxigenase
CP	Controle positivo
CTL	Contagem total de leucócitos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EHCS	Extrato Hidroalcolico da <i>Cunila spicata</i>
EPM	Erro padrão de média
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
SUS	Sistema Único de Saúde
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	<i>CUNILA SPICATA</i>	17
2.2	RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS E CÉLULAS ENVOLVIDAS	19
2.3	MEDIADOR PRÓ-INFLAMATÓRIO	20
2.4	LAVADO BRONCOALVEOLAR E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	MATERIAL BOTÂNICO	22
3.2	EXTRATO VEGETAL HIDROALCÓOLICO	22
3.3	EXPERIMENTO IN VIVO	23
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	23
3.5	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	25
3.6	CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.....	25
3.7	APARELHOS E EQUIPAMENTOS LABORATORIAIS	26
3.8	DROGAS E REAGENTES	26
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1.1	Toxicidade	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O sistema respiratório é acometido por diversas doenças e condições que possuem etiologia e patogenia únicas. São doenças complexas, envolvendo inúmeros mediadores, vias bioquímicas e imunológicas, portanto, foram desenvolvidos diversos modelos animais utilizados para o estudo e pesquisa de alterações agudas no sistema respiratório. Os exemplos mais utilizados são os modelos de inalação, pleurisia e instilação traqueal com um agente flogístico visando replicar, mesmo que não de forma integral, os acontecimentos durante a lesão pulmonar aguda (Matute-Bello, Frevert, Martin, 2008; Menegazzi *et al.*, 2008; Pelgrim *et al.*, 2022; Ehrentraut *et al.*, 2019).

Nem todos os mecanismos envolvidos nas alterações pulmonares estão esclarecidos, como informações sobre os mediadores inflamatórios responsáveis por ativar a resposta de remodelamento do pulmão e exacerbação da reatividade das vias aéreas frente ao estímulo nocivo, podendo ele ser químico, alérgico, traumático, bacteriano ou viral (Matute-Bello, Frevert, Martin, 2008)

A *Cunila spicata* Benth é uma erva rasteira nativa da região sul do Brasil, do Uruguai e da Argentina (Toledo *et al.*, 2004), também conhecida como poejo, poejinho ou poejo do campo. Faz parte da família Lamiaceae e apresenta folhas simples, opostas, pecioladas, glabras, com bordo serrado e tricomas glandulares (Aita *et al.*, 2009). Historicamente, é empregada na medicina tradicional para tratar doenças do sistema digestivo e respiratório, como diarreias, enjoos, tosse crônicas, bronquite, gripes, rinite, e também possui ação expectorante (Vendrusculo, 2004) e antioxidante (Sbaraini *et al.*, 2005).

Seguindo as diretrizes propostas pela OMS, o Ministério da Saúde implementou em 2006 o PNPICS (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares) no SUS, que surgiu com o objetivo de ampliar a aceitabilidade e acessibilidade de fitoterápicos e tratamentos alternativos. Com essa medida, foi formalizada a introdução do uso de plantas no SUS. Atualmente o SUS oferece 12 medicamentos fitoterápicos, todos eles aprovados pela ANVISA (Ministério da Saúde, 2006), e destes medicamentos, podemos destacar o guaco, planta fitoterápica com potente ação broncodilatadora, expectorante, anti-inflamatória e antialérgica (Czelusniak *et al.*, 2012).

A *C. spicata* é uma planta medicinal nativa da região sul da América Latina, com predominância na floresta das araucárias, e que possui forte etnoindicação a partir do movimento tropeirista nos séculos XVII e XVIII (Godoy, 2005; Mazurana; Dias; Laureano, 2016). As ações farmacológicas da *C. Spicata* sob um modelo de inflamação de vias aéreas

comparado a um anti-inflamatório não esteroide tem como objetivo elucidar ações anti-inflamatórias e inibitórias sobre processos inflamatórios induzidos quimicamente que as plantas por ventura possam apresentar sob um modelo de inflamação das vias aéreas, visando a investigação do potencial da *C. spicata* como opção terapêutica associada ao tratamento de processos patológicos inflamatórios das vias aéreas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cunila spicata*

A *C. spicata* é uma planta fitoterápica com característica de subarbusto que faz parte da seção Spicatae, família Lamiaceae (Agostini; Echeverrigaray; Souza-Chies, 2008; Schlemper *et al.*, 2024) que apresenta maior grau de importância em relação a diversidade, frequência de citação e concordância com a sua utilização como tratamento para afecções dos sistemas respiratório e digestivo (Pilla; Amorozo; Furlan, 2006). É definida botanicamente como uma planta aromática perene, rizomatosa, ramificada, com folhas oblongas e obovadas e inflorescências nas extremidades (Figura 1). Cresce em solos arenosos, argilosos, úmidos e iluminados. Floresce na primavera e apresenta uma distribuição geográfica pela região Sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Xifreda; Mallo, 2006).

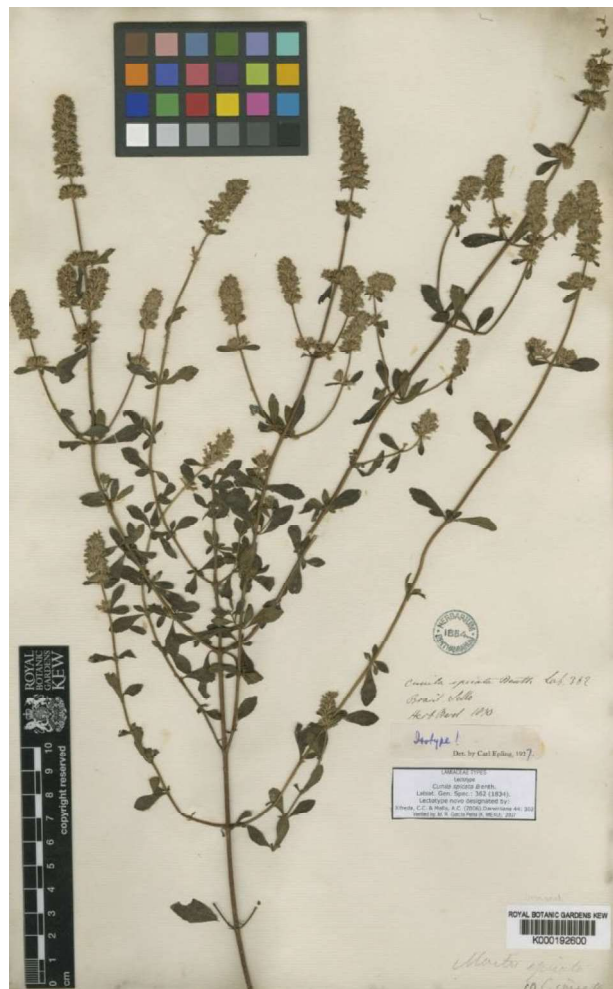


Figura 1. Fonte: Royal Botanic Gardens,

Etnofarmacologicamente falando, é usada na medicina tradicional popular, e suas partes aéreas são utilizadas no preparo de chás e xaropes, com diversas finalidades, tais como como calmante infantil, expectorante, no tratamento de dores abdominais, infecções, rinite, tosse, bronquite, gripes, resfriados e outras afecções pulmonares (Vendrusculo; Rates; Mentz, 2005). É conhecida como poejinho-do-campo e muitas espécies da família Lamiaceae são chamadas popularmente com essa denominação (Bordignon; Schenkel; Spitzer, 1997). A *C. spicata* está entre as 100 espécies com maiores valores de importância relativa considerando estudos etnobotânicos brasileiros de plantas medicinais (Medeiros; Ladio; Albuquerque, 2013).

A composição fitoquímica da planta apresenta compostos tais como sesquiterpenoaldeído, o isocariofileno-13-al; variados monoterpenos como o diacetato de isorosiridol, 3-sitosterol, fitol, cadinol, linalol, dihidrocarveol, geranil e acetato de nerila, bem como ésteres de ácido oleuropeico com glicose, betulalbusideo A, roseosídeo, monoterpenotriol e terpenóides glicosídicos derivados de linalol, linalol hidroxilado e 1,8-cineol (Manns, 1993, 1995; Manns; Hartmann, 1992, 1994).

Dos fito constituintes identificados na *C. Spicata*, um dos principais é o mentofurano (Schlemper *et al.*, 2024), pertencente ao grupo mentano, o qual apresenta efeito significativo sobre distúrbios respiratórios (Agostini *et al.*, 2009; Apel *et al.*, 2009). Porém, este composto possui relatos de implicações hepatotóxicas (Bordignon; Schenkel; Spitzer, 1997). Apel *et al.* (2009) encontrou também o monoterpeno borneol, pertencente ao grupo bornano, que apresentou importante atividade anti-inflamatória e cicatrizante (Nascimento-Júnior *et al.*, 2017). Há ainda a presença do monoterpeno limoneno, encontrado também no extrato metanólico do escaravelho *Ulomoides dermestoides*, do qual estudos relatam semelhante efeito farmacológico quando comparado ao AINE nimesulida em ovos fertilizados de galinha (Mendoza; Saavedra, 2013). O limoneno também demonstrou capacidade de inibir significativamente o crescimento micelial *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, o mofo branco (Dias *et al.*, 2019), e inibiu *Staphylococcus aureus* através do extrato de *Origanum vulgare* e de *Ruta graveolens* (Ruíz *et al.*, 2017).

Echeverrigaray *et al.* (2009) identificou na *C. spicata* 23 diferentes compostos oriundos de amostras coletadas em 10 localidades distintas no estado do Rio Grande do Sul. Dentro destes, o 1,8-cineol, limoneno, linalol, di-hidrocarveol, di- hidrocarvona, terpinen-4-ol e o α -terpineol foram detectados em maiores concentrações (Echeverrigaray *et al.*, 2016). Horn *et al.*, 2016, demonstrou que a *C. spicata* apresenta atividade estimulante sobre a acetilcolinesterase em eritrócitos, promovendo no organismo uma defesa contra intoxicações por agroquímicos e efeito benéfico sobre parâmetros de estresse oxidativo, incluindo potencial antibacteriano. Estas

características estão associadas a presença de fitoquímicos como compostos fenólicos incluindo flavonoides, cumarinas e taninos condensados (Felisbino *et al.*, 2014).

A composição fitoquímica de plantas muda de acordo com o ambiente no qual ela se desenvolve. Schlemper *et al.*, 2023, realizou a análise fitoquímica da *C. spicata* proveniente do município de Bom Retiro, no Planalto Catarinense. Dentre os quatorze compostos identificados, o 2-Bornanona (49,09%) foi o principal composto e o Mentofurano (12,78%) foi o segundo principal composto, ambos monoterpenos. Essa classe de compostos, além de serem aromáticos, apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (Holetz *et al.* 2002).

A literatura já indica que a espécie possui efeito antimicrobiano, considerando que a sálvia e alecrim apresentam alguns compostos iguais aos encontrados na *C. spicata* (1-8-cineol, pineno e cânfora (2-bornanona)) (Godoy, 2003). Catalina *et al.*, 2011, ao pesquisar sobre a ingestão de diferentes espécies de *Cunila spp.*, descobriu que este grupo de plantas não possuem pulegona, uma substância hepatotóxica e pneumotóxica em camundongos.

2.2 RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS E CÉLULAS ENVOLVIDAS

A resposta imunológica é composta por células infiltradas na mucosa e produção de moléculas pró-inflamatórias, sendo que cada uma possui papel fisiopatológico específico. As principais são os fagócitos, compostos por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos; células natural killers (NK); mastócitos, basófilos e eosinófilos. Dos componentes do sistema imune adaptativo, há duas classes de células especializadas, as células T, células B e células dendríticas (Medzhitov; Janeway, 2000; Cruvinel *et al.*, 2010).

Há dois tipos de resposta imunológica, classificadas em inata e adaptativa. Quando exposta a uma ameaça, patógeno ou substância nociva, ambas operam com o propósito de defender o organismo e restaurar a estrutura e a funcionalidade de um tecido lesionado, atuando em conjunto com seus mediadores e mecanismos. Ocorre o desencadeamento de uma cascata de inflamação regulados por mediadores peptídicos, mediadores lipídicos, derivados da circulação e cininas, tendo suas atuações e interferências determinadas pela ampla variedade de sua constituição química (Balbino; Pereira; Curi, 2005; Rang *et al.*, 2016).

O progresso na compreensão da interação complexa entre inflamação aguda, crônica e remodelamento tecidual das vias aéreas foi baseado primariamente com modelos animais submetidos à inflamação induzida por alérgenos, mas também modelos animais de inflamação ou infecção induzidos quimicamente (Boonpiyathad *et al.*, 2019).

2.3 MEDIADOR PRÓ-INFLAMATÓRIO

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado composto de um agrupamento de monômeros de galactose e grupos sulfatos, extraída de algas marinhas vermelhas, abundante nas zonas rochosas das Ilhas Britânicas da Europa e América do Norte. De acordo com Rosa, 1972, esse composto demonstra amplo espectro de interferência nos sistemas biológicos, ao induzir a liberação não seletiva da “sopa inflamatória” e gerando respostas inflamatórias agudas, como a formação de edemas. Na apresentação crônica, resulta no surgimento de nódulos de natureza inflamatória como os granulomas. Sua utilização em pesquisas é uma conduta antiga, principalmente como irritante para induzir a formação de edema em modelos experimentais de “edema de pata” em roedores e em outros modelos *in vivo* (Winter; Risley; Nuss, 1962; Niemegeers; Verbruggen; Janssen, 1964), assim como sua utilização frequente em modelos de pleurisia e instilação traqueal (Fröde e Medeiros, 2001; Busnardo *et al.*, 2010; Kassuya, *et al.*, 2021; Menegazzi *et al.*, 2008; Vernooy *et al.*, 2001; Ehrentraut *et al.*, 2019; Pelgrim *et al.*, 2022).

Esse composto é comumente utilizado como agente agonístico em modelos que buscam mimetizar modelos de inflamação aguda das vias aéreas visando a elucidação de seus mecanismos de ação, assim como comparar a ação de um composto ou fármaco com drogas que possuem propriedades anti-inflamatórias, esteroides ou não (Fusco *et al.*, 2017; Mariotto *et al.*, 2008; Menegazzi *et al.*, 2008).

Sua utilização mais comum para estudos da inflamação das vias aéreas é em modelos de pleurisia, instilação traqueal e nebulização. No modelo de pleurisia, o animal é sedado e a carragenina é injetada diretamente no espaço pleural, podendo ser feito de forma intratorácica (considerado método não invasivo) (Fröde e Medeiros, 2001; Busnardo *et al.*, 2010; Kassuya, *et al.*, 2021) ou de forma cirúrgica (considerado método invasivo), a partir de uma abertura no tórax do animal, possibilitando a injeção do agente flogístico na cavidade pleural, havendo um período de recuperação pós cirúrgica (Di Paola *et al.*, 2005; Menegazzi *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2020; Mamashli *et al.*, 2022). No modelo de instilação traqueal, também é necessária a sedação dos animais para que a deposição da carragenina na traqueia seja feita de forma integral e haja absorção da quantidade almejada de forma adequada (Vernooy *et al.*, 2001; Ortiz-Muñoz e Looney, 2015; Ehrentraut *et al.*, 2019; Pelgrim *et al.*, 2022).

2.4 LAVADO BRONCOALVEOLAR E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O BAL é o líquido recuperado do processo de lavagem das estruturas da árvore brônquica, a qual contribui para a investigação dos fenômenos imunológicos locais e inflamatórios do sistema respiratório (Reynolds, 1987). Pesquisas que tem como objetivo identificar e analisar os processos inflamatórios das vias aéreas com frequência utilizam o método do BAL, devido a sua indicação para investigação da celularidade envolvida no processo inflamatório (Lehmann; Williams, 2019).

Durante as pesquisas para o desenvolvimento e descoberta de um novo fármaco, muitas etapas são de realização obrigatória. Uma delas são os ensaios pré-clínicos, que compreendem os estudos farmacológicos *in vivo* em modelos animais (Calixto, 2016). Em estudos em que o objetivo é avaliar as doenças que afetam o sistema respiratório e imunológico, são utilizadas ferramentas que permitem investigação eficaz dos mecanismos e progressão da patologia estudada, frequentemente acompanhados da utilização de animais de laboratório nos modelos experimentais (Kucharewicz; Bodzenta-Lukaszyk; Buczko, 2008), dado que, em grande parte dos casos, a morfologia das células diferenciais desses animais corrobora com a hipótese de doença (Campbell, 2007).

Os camundongos, em especial a linhagem BALB/c, são frequentemente utilizados em pesquisas de investigação de doenças do trato respiratório (Kumar; Herbert; Foster, 2008) devido a sua resposta positiva a sensibilização e exposição a alérgenos (Whitehead *et al.*, 2003), certificando que esses modelos experimentais expressam inúmeras vantagens quando comparadas com outros modelos animais (Gualdi *et al.*, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizadas as partes aéreas da *C. spicata*, as quais foram coletadas em 2021 no município de Bom Retiro, no Planalto Catarinense, em remanescentes preservados da floresta das Araucárias no período de primavera/verão, coincidindo então com o estágio de florescimento. A identificação botânica foi realizada por botânico especializado e uma exsicata foi depositada em Herbário oficial.

Figura 1 – *C. spicata* jovem e em floração.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

3.2 EXTRATO VEGETAL HIDROALCÓOLICO

O método de obtenção material seco da planta foi realizado conforme Mašković *et al.* (2017) por colaboradores (Schlemper, *et al.*, 2023) na UFFS, *campus* Realeza. As partes aéreas (clores e folhas) da planta foram selecionadas e trituradas em frações menores, pesadas e imersas em álcool etílico P.A 99,8% (100ml de solvente para cada 5g de material botânico). Em seguida, a mistura foi submetida à extração assistida por ultrassom (Hielscher Ultrasound Technology, UP200S/S314T) por 30 minutos, amplitude de 65% e ciclo de 1,0. O preparado foi filtrado em funil de vidro com papel filtro qualitativo e o extrato obtido foi concentrado em rota evaporador (IKA, RV10, HB10 digital), com auxílio de uma bomba de hidrovácuo (SL 190, SOLAB) a 70°C e 100 RPM até a evaporação parcial do solvente, obtendo-se um material viscoso de cor esverdeada. Esse material foi distribuído em placas de Petri que foram para estufa a uma temperatura de 40 °C por 2 a 3 dias, até a secagem completa do solvente. Após a secagem, o material seco foi raspado da placa de Petri com auxílio de uma espátula de aço inox e

acondicionado em frasco âmbar hermeticamente fechado, mantido em congelador (-18 °C) até o início dos experimentos.

Para a administração nos camundongos, o extrato seco foi dissolvido em DMSO a 5% e em seguida diluído em PBS nas concentrações desejadas, sendo submetido a agitação em equipamento ultrassônico e vórtex minutos antes de iniciar o protocolo.

3.3 EXPERIMENTO IN VIVO

O presente trabalho foi submetido e aprovado no Conselho de Ética do Uso de Animais (CEUA) sob o número 5330020523. Foram utilizados camundongos Balb-C isogênicos (N = 30) pesando 25 a 30 gramas, provenientes do Biotério Central da UFFS, Campus Realeza - PR, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada a cerca de $23 \pm 1^\circ \text{C}$, tratados com água destilada e ração comercial para roedores fornecidos *ad libitum* até momentos antes de serem submetidos às condições experimentais. Os animais permaneceram no Laboratório de Farmacologia para adaptação por um período de no mínimo duas horas antes da realização dos experimentos que foram conduzidos normalmente entre 7 a 10 horas.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O método utilizado foi a migração celular induzida por carragenina via nebulização, seguido pela realização do BAL. Os experimentos *in vivo* utilizaram cinco grupos experimentais aleatórios: o grupo controle (CN) (N = 6) recebeu PBS, o grupo controle positivo (N = 6) recebeu meloxicam (Melox) na dose de 2mg/kg (Foley, Kendall e Turner, 2019) e os grupos tratados com o EHCS receberam doses crescentes de 30, 100 e 300mg/kg (N = 6 cada grupo), todos V.O na forma de gavagem em dose única.

Todos os grupos foram pré-tratados uma hora antes do início do experimento. A nebulização contínua ocorreu em câmara plástica com carragenina (300 µg/ml), através de micro nebulizador (60 Hz-200 VA) com taxa máxima de nebulização (0,40ml/min) por três minutos (Figura 2). Passadas 2 horas após inalação, os animais foram eutanasiados com sobredose de cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg) intraperitoneal (IP), seguido de deslocamento cervical (Shomer *et al.*, 2020).

Figura 2 – Camundongos Balb/C na câmara de nebulização.

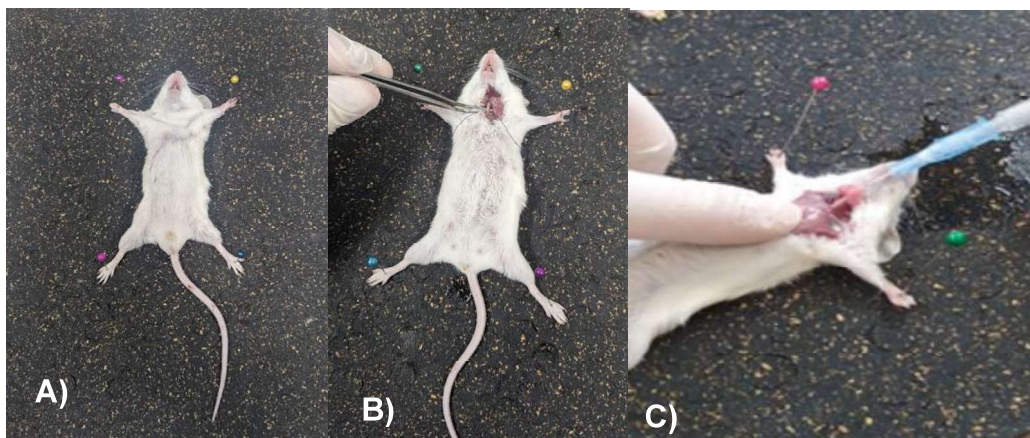


Fonte: Arquivo Pessoal, 2024.

A seguir, foi realizado o ensaio de BAL, seguindo a metodologia descrita anteriormente com pequenas modificações (Lagente *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2006). Os animais foram fixados em mesa cirúrgica com um declive de 45° (Figura 3 - A), sendo feita uma incisão transversal da pele na região do manúbrio. As tireoides foram afastadas e a traqueia isolada, sendo exposta e seccionadas parcialmente em nível cervical médio (Figura 3 - B). Um *scalp* adaptado foi utilizado para a lavagem pulmonar, feita com 1,0ml de PBS heparinizado (10µl/ml). O volume injetado nos pulmões foi coletado por aspiração com uma seringa de 1ml enquanto o tórax foi massageado suavemente (Figura 4). O procedimento de injeção de PBS foi realizado duas vezes, totalizando 2,0ml de PBS heparinizado.

Figura 3 – Método de BAL em camundongos.

A) Camundongos Balb/C posicionado em declive de 45°. B) Traqueia isolada. C) *Scalp* adaptado, injetando



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O volume coletado anteriormente do BAL foi acondicionado em tubos de Eppendorf de 2ml e foram mantidos refrigerados em gelo até o momento da centrifugação, que ocorreu em centrífuga de bancada por cinco minutos a 2000 RPM. Em seguida, o sobrenadante foi reservado para análises posteriores e os pellets no fundo do Eppendorf ressuspensos em 1,0ml de PBS.

3.6 CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Para leitura do número total de leucócitos, uma alíquota de 100µl da ressuspensão anterior foi adicionada à 100µl de líquido de Turk. Os 200µl foram utilizados para preencher a câmara de Neubauer espelhada, desprezando as primeiras gotas, na objetiva de 40x. Para determinar a quantidade de leucócitos na amostra, o número de células encontradas foi dividido pelo número total de quadrantes, indicando a média, multiplicado pelo fator de diluição e o produto multiplicado por 10^4 , sendo este o fator de correção da altura da câmara.

$$\frac{N^{\circ} \text{ total de células}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes}} \times \text{Fator de diluição} = \left(\frac{V \text{ amostra} + V \text{ líquido de Turk}}{V \text{ amostra}} \right)$$

A alíquota restante de 0,9ml foi utilizada para a contagem diferencial de leucócitos. A técnica foi realizada a partir da câmara de Suta para obter a sedimentação celular. Com uma micropipeta, foi depositado um volume suficiente de amostra para preencher o orifício do papel filtro, e em seguida, foi submetida a secagem em estufa a 30°C. Após esse tempo, as lâminas foram coradas com panóptico simples rápido.

Com o apoio de um microscópio óptico comum com a lente objetiva de imersão (aumento de 1000x), as células foram contadas até 200 unidades por lâmina. A classificação entre os diferentes tipos de leucócitos foi baseada no tamanho da célula e citoplasma; cor e tamanho, presença ou não de grânulos do citoplasma; cor e posição do núcleo, seguido do formato, podendo ser segmentado ou não; disposição da cromatina, podendo ser frouxa ou condensada (Campbell, 2007; Raskin e Meyer, 2011, Daubeuf e Frossard, 2012).

Os leucócitos foram contados no aplicativo para celular *Cell Counter* e os resultados foram expressos em porcentagem de células predominantes.

3.7 APARELHOS E EQUIPAMENTOS LABORATORIAIS

Agulha para gavagem (nº 12); balança analítica 220g/82g com relógio (SHIMADZU, AUW220D); balança semi analítica, capacidade 6200g (SHIMADZU, UX6200H); balança digital de precisão cap. 1000 g (LIVON); câmara de Neubauer espelhada (BOECO); câmara de sedimentação (Suta); centrífuga de banca refrigerada SL - 703 (SOLAB); estufa de secagem e esterilização (ODONTOBRAS); instrumental cirúrgico; lâminas e lamínulas para microscopia; micropipeta monocal volume variável de 20 a 200µl (EPPENDORF/ALEMÃO); micropipeta monocal, volume variável de 100 a 1000µl (BRAND, TRANSFERPETTE S 10 – 1000 VL); microscópio biológico binocular (OLYMPUS, CX23); microtubo de 1,5ml incolor (Eppendorf); inalador compressor (OMRON); papel filtro qualitativo; ponteiros para micropipeta 0-200µl e 200-1000µl; refrigerador (ELECTROLUX); vidrarias laboratoriais; seringas descartáveis de 1mL (Descarpack); banho de aquecimento (Solidsteel); agitador Vortex-MS (Labomarsa).

3.8 DROGAS E REAGENTES

Álcool etílico absoluto 99,8% P. A. (Neon); carragenina lambda (Sigma-Aldrich); coloração panóptico simples rápido (NewProv); heparina sódica 5000µl/ml fr-amp 5ml (Hepamax-S – Blau Farmacêutica); líquido de Turk (BioTec); PBS (SigmaAldrich); óleo de imersão; DMSO (Neoquímica); meloxicam 0,2% (Elo-Xicam – Chemitec).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, com um N de 6 animais cada grupo experimental. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via, seguido dos testes de múltiplas comparações de Dunnett.. Para os valores serem considerados significantes, os valores de P foram menores do que 0,05. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico *GraphPad Prism version 8.0*.

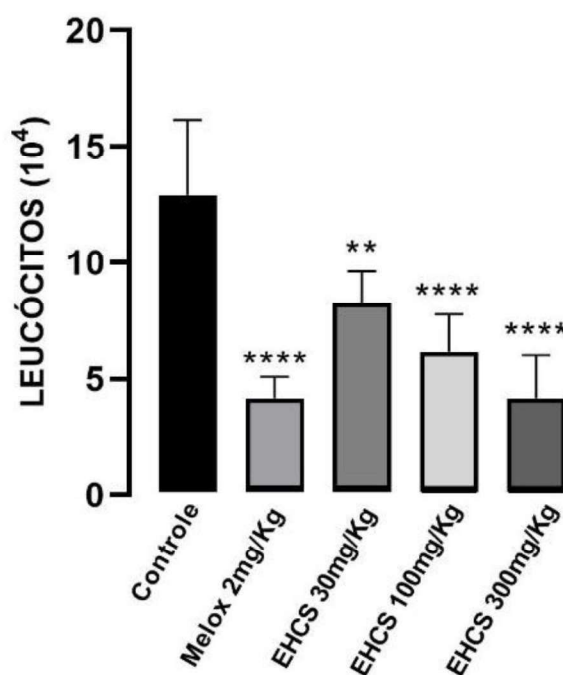
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de inflamação das vias aéreas por nebulização com carragenina utilizada no presente trabalho foi descrita por Schlemper *et al.*, 2023. Em seu estudo, foi avaliado a ação de diferentes compostos pro inflamatórios via nebulização quando tratados com extrato hidroalcolico da *C. spicata* em três doses (30 mg/Kg, 100 mg/Kg e 300 mg/Kg) e do glicocorticoide prednisolona (4 mg/Kg). A utilização de uma câmara de nebulização permite com que vários animais sejam medicados simultaneamente, não requerendo anestésicos e nem procedimento cirúrgico, implicando em menor sofrimento animal, maior velocidade e praticidade na aplicação do agente inflamatório, sendo de fácil acesso e replicabilidade.

Durante a CTL, foi possível observar aumento significativo no recrutamento de leucócitos totais nos pulmões dos animais submetidos à nebulização com carragenina (Gráfico 1). O EHCS reduziu de maneira significativa a quantidade de leucócitos, com perfil de inibição dose-dependente, quando comparado ao grupo CN. O grupo 300mg/kg apresentou resultados semelhantes do grupo CP.

Comparando ao CN, as inibições máximas obtidas foram $49,84 \pm 5,35$ para a dose de 30 mg/Kg, $61,66 \pm 4,55$ para a dose de 100 mg/Kg e $75,30 \pm 2,86$ para a dose de 300 mg/kg.

Gráfico 1 - Efeito inibitório médio do EHCS V.O e do meloxicam sobre a migração de células inflamatórias totais no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C, induzidas pela nebulização de carragenina (300 µg/ml). Cada barra representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam os EPM. Diferem do grupo controle **P < 0,01 e ****P < 0,0001.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

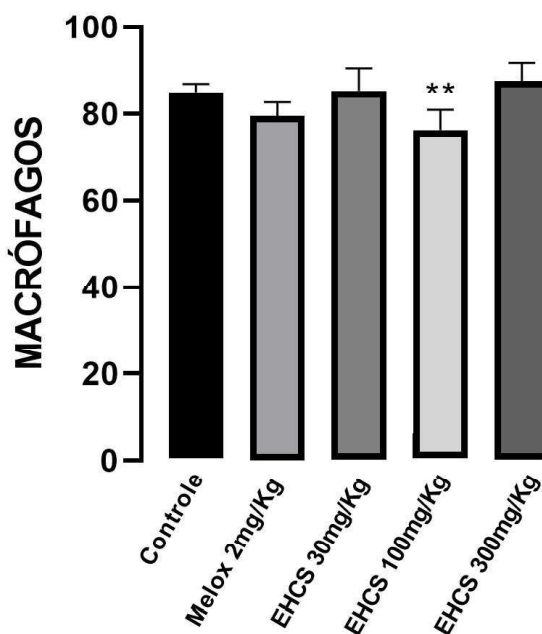
Modelos de inflamação aguda em vias áreas são em geral caracterizados por acúmulo de fluido e presença de grande quantidade de leucócitos (Cunha 2001 e 2017; Menegazzi *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2018; Di Paola *et al.*, 2005). A CTL obtidas em nosso estudo corrobora com os descritos anteriormente, e também replicam os resultados publicados por Schlemper *et al.*, 2023.

Saleh, Calixto e Medeiros, 1999, realizaram um modelo de pleurisia com análise do lavado da cavidade pleural. Foi utilizado meloxicam na dose de 5 mg/Kg V.O meia hora antes da indução de pleurisia por carragenina em camundongos. Os resultados encontrados foram de $2.6 \pm 0.2 \times 10^6$ leucócitos totais para o grupo tratado e $5.6 \pm 0.2 \times 10^6$ do grupo controle ($P < 0.01$). Nosso estudou apresentou os resultados de $12.9 \pm 1.1 \times 10^4$ CTL no grupo controle e $4.1 \pm 1.1 \times 10^4$ do grupo tratado com meloxicam ($P < 0.0001$). A diferença entre os resultados pode ser justificada pela diferença da dose e tempo de ação do fármaco anteriormente à exposição ao agente flogístico, diferença da técnica e líquido cavitário avaliado.

Durante a contagem diferencial de células inflamatórias, macrófagos foram as células encontradas em maior quantidade em todos os grupos (Gráfico 2). Não houve inibição significativa entre o grupo CN e CP e em duas doses do extrato. Apenas o grupo que recebeu a dose de 100mg/kg teve resultados inibitórios significativos, com $P < 0.01$.

Gráfico 2 - Efeito inibitório do EHCS V.O e meloxicam V.O. sobre a migração de macrófagos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C, induzidas pela nebulização de carragenina (300 $\mu\text{g/ml}$). Cada barra representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam os EPM.

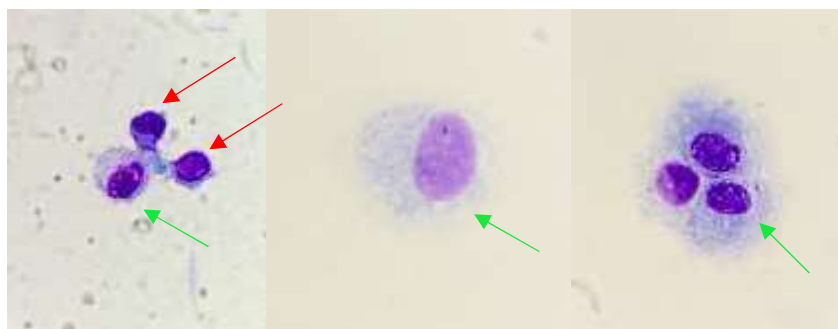
Diferem do grupo controle $**P < 0,01$.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Figura 3 – Macrófagos e linfócitos no BAL.

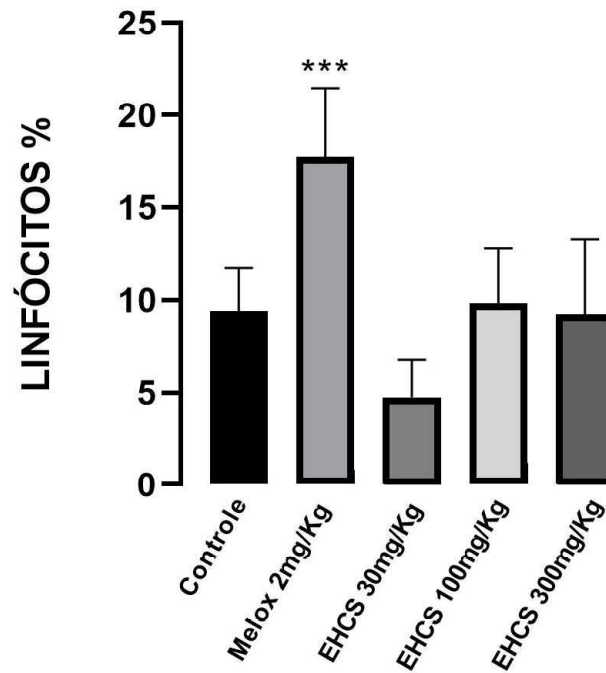
Setas vermelhas apontam para linfócitos e setas verdes apontam para macrófagos. Lente objetiva de 100x e óleo de imersão. Microscópio óptico OLYMPUS CX23.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Os linfócitos foram as células encontradas em segunda maior quantidade (Gráfico 3), com o grupo CP apresentando aumento significativo ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo CN. As doses de EHCS não interferiram significativamente nessa percentagem.

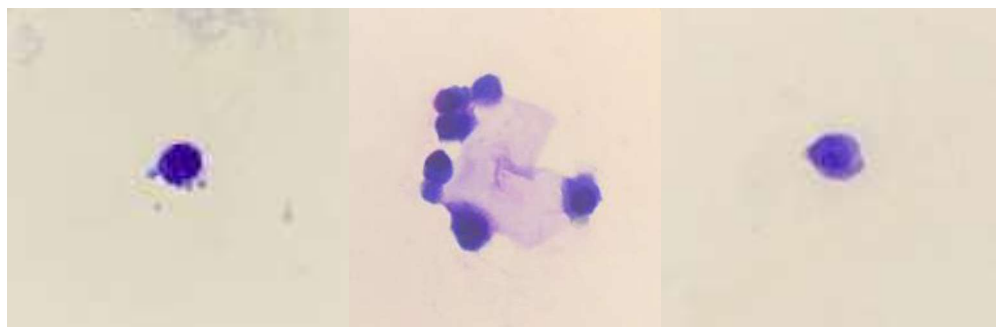
Gráfico 3 - Efeito inibitório do EHCS V.O sobre a migração de linfócitos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C, induzidas pela nebulização de carragenina (300 µg/ml). Cada barra representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam os EPM. Diferem do grupo controle ***P < 0,001.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 4 – Linfócitos no BAL.

Lente objetiva de 100x e óleo de imersão. Microscópio óptico OLYMPUS CX23.

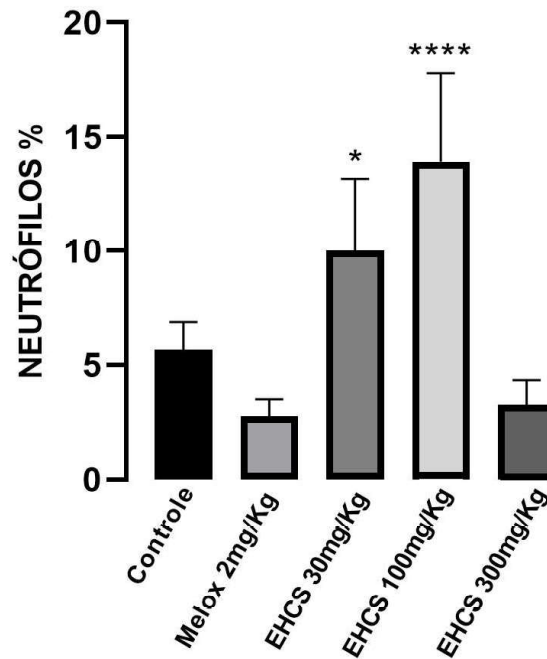


Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

A administração do EHCS promoveu um aumento paradoxal no número de neutrófilos (Figura 5 e Figura 7). O grupo 30 e 100mg/kg apresentaram resultados significativos com aumentos de $10,00 \pm 4,333\%$ e $13,92 \pm 8,250\%$, respectivamente no influxo dessas células para o BAL e o grupo 300 mg/kg apresentou o resultado similar ao grupo CP (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeito inibitório do EHCS V.O e meloxicam V.O. sobre a migração de neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C, induzidas pela nebulização de carragenina (300 µg/ml). Cada barra representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam os EPM.

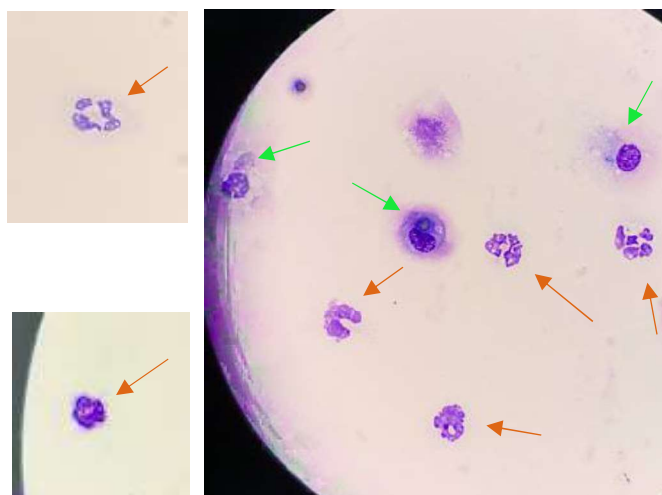
Diferem do grupo controle *P < 0,01 e ****P < 0,0001.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024

Figura 5 – Neutrófilos no BAL.

Setas verdes apontam para macrófagos e setas laranjas indicam neutrófilos. Lente objetiva de 100x e óleo de imersão. Microscópio óptico OLYMPUS CX23.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Modelos de pleurisia por carragenina são marcados por migração celular, com destaque para os neutrófilos (Santos *et al.*, 2014). A CDL é importante para avaliar de forma mais abrangente os sinais de inflamação relacionados ao trato respiratório. Em relação a contagem diferencial, a presença de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Tabela 1) encontrados são consistentes com o descrito na literatura (Barbosa *et al.*, 2013; Schlemper *et al.* 2023) assim como modelos de instilação traqueal, que por sua vez apresentaram infiltração de leucócitos totais e neutrófilos em ratos (Mamashli *et al.*, 2022). Um estudo feito por Saleh, Calixto e Medeiros, 1999, apresentou predominância de neutrófilos, e em segundo lugar, a presença de mononucleares com 4 horas após a indução da pleurisia.

Tabela 1 - Parâmetros da contagem diferencial de leucócitos do lavado broncoalveolar de camundongos submetidos a nebulização por carragenina.

Valores expressos em Média (%) $\pm$ EPM

	Macrófagos	Linfócitos	Neutrófilos Bastonetes
Controle (PBS)	84,92 $\pm$ 2,601	9,417 $\pm$ 1,801	5,667 $\pm$ 1,375
Melox 2m/Kg	79,50 $\pm$ 5,417	17,75 $\pm$ -8,333	10 $\pm$ -4,333
30 mg/Kg	84,00 $\pm$ 0,9167	4,750 $\pm$ 4,667	0 $\pm$ 1,250
100 mg/Kg	76,25 $\pm$ 8,667	9,833 $\pm$ -0,4167	13,92 $\pm$ -8,250
300 mg/Kg	87,50 $\pm$ -2,583	9,250 $\pm$ 0,1667	3,250 $\pm$ 2,417

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

No presente estudo, as células inflamatórias presentes em maior quantidade foram macrófagos, enquanto Schlemper *et al.*, 2023, teve alto número de linfócitos. A diferença no grupo CP é devido a utilização de fármacos que possuem mecanismos de ação distintos, pois

aqui utilizamos o meloxicam, droga AINE que possui predileção para COX-2, enquanto a autora utilizou a prednisolona, um glicocorticoide.

A cicloxigenase é uma glicoproteína que faz parte da cascata do ácido araquidônico, via metabólica essencial para que ocorra a resposta inflamatória do organismo. Possui três isômeros identificados: COX-1, COX-2 e COX-3 (De Groot, *et al.*, 2007). A COX-2 está associada tanto ao início da inflamação quanto à fase final de resolução (Sugimoto *et al.*, 2016) e Gilroy e Colville-Nash, 2000, relatam que camundongos que não possuíam o gene para COX-2 apresentaram menor infiltração linfocítica e edema quando comparados a camundongos *wild type*. Quando utilizado um glicocorticoide, diversos autores relatam a diminuição de leucócitos totais, especialmente neutrófilos frente a dexametasona (Bayir *et al.*, 2018; Saleh, Calixto e Medeiros, 1999; Aoyagi, 2019).

A maior presença de neutrófilos no grupo de 100 mg/Kg indica um efeito pró-inflamatório paradoxal, no qual houve maior influxo de células polimorfonucleares. Alto incidência neutrófilica é comumente associada a maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como (García-Escobar *et al.*, 2023) quimio-atraente de queratinócitos (KC, também conhecido como CXCL1) e proteína inflamatória de macrófagos 2-alfa (MIP-2 α , também conhecida como CXCL2) (Grommes e Soehnlin, 2011).

Um possível justificativa para o grande número de monócitos encontrados é uma intensificação na conversão do processo neutrófilico associado ao processo inflamatório das vias aéreas para um quadro de inflamação crônica. Há pouca informação disponível na literatura sobre quando e como essa mudança ocorre, além de ser dependente do modelo experimental empregado (Headland e Norling, 2015; Patel, Wilson e Takata, 2012).

A ação anti-inflamatória do EHCS vista na CTL pode estar associada à presença do principal composto, um terpeno, que faz parte da sua composição fitoquímica. O 2-bornanone, também chamado de cânfora (NCBI), identificado em maior quantidade, já é conhecido pelas suas capacidades anti-inflamatórias e extensa literatura que comprova sua ação antimicrobiana (Zouine *et al.*, 2024; De Lima *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2009).

4.1.1 Toxicidade

Nas doses utilizadas em nosso protocolo experimental é possível afirmar que o EHCS não apresentou toxicidade aguda durante o período do experimento, corroborando os resultados obtidos anteriormente por Schelmer *et al.*, 2023.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato hidroalcólico da *C. spicata* apresentou efeito inibitório dose dependente sobre a migração de leucócitos totais no lavado broncoalveolar de camundongos submetidos à nebulização por carragenina. As células encontradas em maior número foram as mononucleares, macrófagos e linfócitos.

Durante o experimento, não foram observados sinais de toxicidade no período e nas doses utilizadas durante o experimento.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, F. *et al.* Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 473-478, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/gwZMhMbZPyn6wHHKjDnQBwc/abstract/?lang=en>. Acesso em 10 de Março de 2024.
- AGOSTINI, G.; ECHEVERRIGARAY, S.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic relationships among South American species of *Cunila* D. Royen ex L. based on ISSR. **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, p. 135-141, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00606-008-0037-8>. Acesso em 22 de Janeiro de 2023
- AITA, A. M.; MATSUURA, H. N.; MACHADO, C. A.; RITTER, M. R. Espécies medicinais comercializadas como “quebra-pedras” em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2ª, p. 471-477, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/dHbBwTNd3TMqFLRVSSmMjTf/?lang=pt>. Acesso em 25 de Maio de 2023.
- ANVISA. Farmacopeia Brasileira, Volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8000json-file-1>. Acesso em 23 de Maio de 2024.
- AOYAGI, T. *et al.* Etoposide and corticosteroid combination therapy improves acute respiratory distress syndrome in mice. **Shock**, v. 52, n. 1, p. 83-91, 2019.
- APEL, M. A. *et al.* Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Parasitology Research Journal**, v. 105, p. 863-868, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421776>. Acesso em: 06 de Junho 2023.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbcbf/v41n1/v41n1a03.pdf>. Acesso em: 08 de Junho de 2024.
- BARBOSA, K. P. S. *et al.* Reduction of carrageenan-induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, n. 1-3, p. 197-205, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24036257/>. Acesso em: 11 de Novembro de 2024.
- BAYIR, Y. *et al.* Effects of Aliskiren, an RAAS inhibitor, on a carrageenan-induced pleurisy model of rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20180106, 2018.
- BOONPIYATHAD, T. *et al.* Immunologic mechanisms in asthma. In: Seminars in immunology. **Academic Press**, 2019. p. 101333. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532319300557>. Acesso em 23 de Janeiro de 2024.

- BORDIGNON, S. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SPITZER, V. The essential oil composition of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1283-1286, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942296007261>. Acesso em: 06 de Junho de 2024.
- BUSNARDO, T. C. P. M. et al. Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 519-525, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109007727>. Acesso em 12 de Setembro de 2024.
- CALIXTO, João. A importância dos estudos pré-clínicos no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. **Fiocruz**, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/20476>. Acesso em 12 de Agosto de 2024.
- CAMPBELL, T. W. Hematologia de mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Roca, São Paulo. 582p, 2007.
- CATALINA, M. B. *et al.* Volatile constituents from aerial parts of *Cunila spicata*. **Journal of Essential Oil Research**. v.13, n. 5, p. 351-353. 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/233276884_Volatile_Constituents_from_Aerial_Parts_of_Cunila_spicata. Acesso em: 12 de Março de 2023.
- CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/QdW9KFBP3XsLvCYRJ8Q7SRb/?lang=en>. Acesso em 10 de Agosto de 2024.
- CUNHA, F. M. *et al.* Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. **Life Sciences**, v. 70, p. 159-169, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11787941/>. Acesso em: 09 de Setembro de 2024.
- CUNHA, J. A. *et al.* Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. e160076, 2017. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/315933610_Essential_oils_of_Cunila_galioides_and_Origanum_majorana_as_anesthetics_for_Rhamdia_quelen_Efficacy_and_effects_on_ventilation_and_ionoregulation. Acesso em: 12 de Julho de 2024.
- CZELUSNIAK, K. E. *et al.* Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 400-409, 2012. CALCULAR correção monetária IPC do IGP (FGV). [S.l.], 2020. Disponível em: <https://www.ecalculos.com.br/utilitarios/ipc-do-igp-fgv.php>. Acesso em: 13 de Novembro de 2023.
- DAUBEUF, F; FROSSARD, N. Performing bronchoalveolar lavage in the mouse. **Current protocols in mouse biology**, v. 2, n. 2, p. 167-175, 2012. Disponível

em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470942390.mo110201>. Acesso em 10 de Agosto de 2024.

DE GROOT, D. J. A. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 1, p. 52-69, 2007.

DE LIMA, V. T. *et al.* Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1298-1302, 2014.

DI PAOLA, R. *et al.* Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. **Respiratory Research**, v. 6, p. 1-13, 2005.

DIAS, A. L. B. *et al.* Chemical composition and in vitro inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three Citrus species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, p. 1-5, julho 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/2019nahead/1519-6984-bjb-1519-6984216848.pdf>. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

DOS SANTOS, E. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory articular effects of essential oil and camphor isolated from *Ocimum kilimandscharicum* Gürke leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113697, 2021.

ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* Chemical variations on the essential oils of *Cunila spicata* Benth. (Lamiaceae), an aromatic and medicinal plant from South Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, London, v. 21, p. 241-245, maio/jun 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/233026385_Chemical_Variations_on_the_Essential_Oils_of_Cunila_spicata_Benth_Lamiaceae_an_Aromatic_and_Medicinal_Plant_From_South_Brazil. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* Population structure and genetic diversity of the medicinal and aromatic plant *Cunila spicata* Benth. (Lamiaceae) based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Journal of Advances in Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 652-658, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/326974938_Population_Structure_and_Genetic_Diversity_of_the_Medicinal_and_Aromatic_Plant_Cunila_spicata_Benth_Lamiaceae_Based_on_Inter-Simple_Sequence_Repeat_ISSR_Markers. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

EHRENTAUT, Heidi *et al.* Inducing acute lung injury in mice by direct intratracheal lipopolysaccharide instillation. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 149, 2019. Disponível em: <https://www.jove.com/t/59999/inducing-acute-lung-injury-mice-direct-intratracheal>. Acesso em 20 de setembro de 2024.

FELISBINO, A. S. *et al.* Preliminary investigation on phytochemical composition and biological activity of *Cunila microcephala* Benth. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 21, p. 780-787, jun. 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265786153_Preliminary_investigation_on_phytochemical_composition_and_biological_activity_of_Cunila_microcephala_Benth. Acesso em: 07 de Junho de 2023.

FOLEY, P. L.; KENDALL, Lon V.; TURNER, P. V. Clinical management of pain in rodents. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 6, p. 468-489, 2019. Disponível em: https://iacuc.hms.harvard.edu/files/hma-acuc/files/clinical_management_of_pain.pdf. Acesso em: 23 de Outubro de 2023.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v. 10, n. 4, p. 223-227, 2001.

FUSCO, R. *et al.* Inhibition of inflammasome activation improves lung acute injury induced by carrageenan in a mouse model of pleurisy. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 8, p. 3497-3511, 2017. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201601349R>. Acesso em: 03 de Outubro de 2024.

GAO, Y. *et al.* Isoliquiritigenin exerts antioxidative and anti-inflammatory effects via activating the keap-1/nrf2 pathway and inhibiting the nf- κ b and nlrp3 pathways in carrageenan-induced pleurisy. **Food & function**, v. 11, n. 3, p. 2522-2534, 2020.

GARCÍA-ESCOBAR, A. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio an inflammatory biomarker, and prognostic marker in heart failure, cardiovascular disease and chronic inflammatory diseases: New insights for a potential predictor of anti-cytokine therapy responsiveness. **Microvascular Research**, p. 104598, 2023.

GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R. New insights into the role of COX-2 in inflammation. **Journal of molecular medicine**, v. 78, p. 121-129, 2000.

GODOY, M. de F. P. Atividade de extratos vegetais e seus derivados sobre o crescimento do fungo simbiote de *Atta sexdens* L. e outros microrganismos. 2003, 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Programa de Pós-graduação, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2003. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/95026>. Acesso em 31 de Março de 2023.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, Oliver. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine**, v. 17, p. 293-307, 2011.

GUALDI, L. P. *et al.* Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 236-242, 2010. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=583399&indexSearch=ID>. Acesso em: 02 de Abril de 2024.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. In: Seminars in immunology. **Academic Press**, 2015. p. 149-160.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031. 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/11001205_Screening_of_some_plants_used_in_the_Brazilian_folk_medicine_for_treatment_of_infectious_diseases. Acesso em: 12 de Março de 2023.

HORN, R. C. *et al.* Avaliação “in vitro” do efeito da infusão de *Cunila microcephala* benth sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase e biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de agricultores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 341-348, 2016. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.phpscript=sci_abstract&pid=S151605722016000500341&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

KASSUYA, R. M. *et al.* *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract reduced il-1 β and inflammatory parameters induced by the *Mycobacterium* complex and carrageenan in mice. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 439-450, 2021. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10787-020-00752-0>. Acesso em 28 de Setembro de 2024.

KUCHAREWICZ, Iwona; BODZENTA-ŁUKASZYK, Anna; BUCZKO, Włodzimierz. Experimental asthma in rats. **Pharmacological reports**: PR, v. 60, n. 6, p. 783-788, 2008. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/19211969>. Acesso em 10 de Março de 2023.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 6, p. 485-494, jun. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537587>. Acesso em: 07 de Março de 2024.

LAGENTE, Vincent *et al.* A nitric oxide-releasing salbutamol elicits potent relaxant and anti-inflammatory activities. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 367-375, 2004. Disponível em: <https://jpet.aspetjournals.org/content/310/1/367.short>. Acesso em 23 de Maio de 2023.

LEHMANN, D. M.; WILLIAMS W. C. Cross-reactivity between halogenated platinum salts in an immediate-type respiratory hypersensitivity model. **Inhalation Toxicology**, v. 30, n. 11-12, p. 472-481, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08958378.2018.1554015>. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

LIMA, J. G. M. *et al.* Modelo experimental de silicose pulmonar em camundongos. **Pulmão**, v. 15, n. 2, p. 64-69, 2006. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wpcontent/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2006/n_02/05.pdf. Acesso em: 30 de Março de 2023.

MAMASHLI, M. *et al.* Anti-inflammatory effects of N-Acetylcysteine and *Elaeagnus angustifolia* extract on acute lung injury induced by λ -carrageenan in rat. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 5, p. 1759-1768, 2022.

MANNS, D. Linalool and cineole type glucosides from *Cunila spicata*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1115-1118, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003194229500108J>. Acesso em: 06 de Junho 2023.

MANNS, D.; HARTMANN, R. Monoterpene glucosides from *Cunila spicata*. **Planta Medica**, v. 60, n. 5, p. 467-469, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17236067>. Acesso em: 06 de Junho 2023.

MANNS, D.; HARTMANN, R. Zur konstitution und konfiguration des isocaryophyllen- 13-al. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 442-444, 1992. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6575134_The_Constitution_and_Configuration_of_Isocaryophyllen-13-al. Acesso em: 06 de Junho 2023.

MANNS, D. New monoterpenes from *Cunila spicata*. **Planta Medica**, v. 59, n. 2, p. 171-173, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230351>. Acesso em: 06 de Junho 2023.

MARIOTTO, S. *et al.* Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. **Pharmacological research**, v. 57, n. 2, p. 110-124, 2008.

MARTÍNEZ, A. L. *et al.* Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. **Planta medica**, v. 75, n. 05, p. 508-511, 2009.

MAŠKOVIĆ, P. *et al.* Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 875-881, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669017306714>. Acesso em: 02 de Abril de 2023.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C.W.; MARTIN, T R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L379-L399, 2008.

MAZURANA, Juliana et al. Povos e comunidades tradicionais do Pampa. Porto Alegre: **Fundação Luterana de Diaconia**, 2016. Disponível em: <https://fld.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Livro-povos-e-comunidades-tradicionais-do-pampa.pdf>. Acesso em 24 de Setembro de 2024.

MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, p. 729-746, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095828>. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10922424/>. Acesso em: 07 de Junho de 2023.

MENDOZA, D. L. M.; SAAVEDRA, S. A. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Vitae, Medellín**, v. 20, n. 1, p. 41-48, jan/apr. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v20n1/v20n1a5.pdf>. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

MENEGAZZI, Marta *et al.* Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 1, p. 22-31, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661808001011>. Acesso em 24 de Setembro de 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção**

Básica. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/politicas/pnpic>. Acesso em 25 de Maio de 2024.

NASCIMENTO-JÚNIOR, B. J. *et al.* Anti-inflammatory and healing action of oral gel containing borneol monoterpene in chemotherapy-induced mucositis in rats (*Rattus norvegicus*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 53, n. 3, p. e00081, jul. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v53n3/2175-9790-bjps-53-03-e00081.pdf>. Acesso em: 02 de Abril de 2023.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2537, Camphor. **PubChem**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Camphor>. Acesso em 21 de Setembro de 2024.

NIEMEGEREERS, C. J. E.; VERBRUGGEN, F. J.; JANSSEN, P. A. J. Effect of various drugs on carrageenin-induced oedema in the rat hind paw. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, n. 12, p. 810-816, 1964. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14254308>. Acesso em: 07 de Março de 2023.

ORTIZ-MUÑOZ, Guadalupe; LOONEY, Mark R. Non-invasive intratracheal instillation in mice. **Bio-protocol**, v. 5, n. 12, p. e1504-e1504, 2015.

PATEL, B. V.; WILSON, M. R.; TAKATA, Masao. Resolution of acute lung injury and inflammation: a translational mouse model. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 5, p. 1162-1170, 2012.

PELGRIM, C. E. *et al.* Intratracheal administration of solutions in mice; development and validation of an optimized method with improved efficacy, reproducibility and accuracy. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 114, p. 107156, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105687192200003X>. Acesso em 24 de Setembro de 2024.

PILLA, Milena Andrea Curitiba; AMOROZO, Maria Christina de Mello; FURLAN, Antonio. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 789-802, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abb/a/K6jDzPJp7BmLZt4LvhPY6jG/?lang=pt&format=html>. Acesso em 23 de Janeiro de 2023.

RANG, Humphrey P. **Farmacologia**. Editora: Elsevier, 2016.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. Citologia de Cães e Gatos: atlas colorido e guia de interpretação. Capítulo 6: **Fluídos de cavidades corporais**. Elsevier Brasil, 2011.

REYNOLDS, H. Y. Bronchoalveolar lavage. **American Review of Respiratory Disease**, v. 135, n. 1, p. 250-263, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3541717/>. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

RUÍZ, L. D. Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. **Revista Electrónica Nova Scientia**, León, v. 9, n. 19, p. 273- 290, jul. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v9n19/2007-0705-ns-9-19-00273.pdf>. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

SALEH, T.S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SANTOS, L. A. M. *et al.* Diethylcarbamazine inhibits NF- κ B activation in acute lung injury induced by carrageenan in mice. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 153-162, 2014.

SCHLEMPER, Valfredo *et al.* Inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Cunila spicata* Benth. on phlogistic agents-induced cellular migration in the airways of mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 311, p. 116477, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874123003458>. Acesso em 10 de Outubro de 2024.

SHOMER, N H. *et al.* Review of rodent euthanasia methods. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 59, n. 3, p. 242-253, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7210730/>. Acesso em 13 de Novembro de 2023.

SUGIMOTO, M. A. *et al.* Resolution of inflammation: what controls its onset?. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 160, 2016.

TOLEDO, M. G.T.; ALQUINI, Y.; NAKASHIMA, T. Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira Ciências Farmacognósticas**. 2004; v.40, n.4, p.487–493. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1516-93322004000400006>. Acesso em 23 de Maio de 2023.

VENDRUSCULO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000400018. Acesso em: 06 de Junho de 2024.

VENDRUSCULO, Giovana Secretti. Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2004. Programa de Pós-Graduação, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2004. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/5147>. Acesso em: 02 de Abril de 2024.

VERNOOY, J. HJ *et al.* Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells: no role for tumor necrosis factor- α and infiltrating neutrophils. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, n. 5, p. 569-576, 2001. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.24.5.4156>. Acesso em 12 de agosto de 2024.

WHITEHEAD, G. S. *et al.* Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **American Journal of Physiology**, v. 285, n. 1, p. L32-L42, jul. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626335>. Acesso em: 02 de Abril de 2024.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14001233>. Acesso em: 07 de Junho 2023.

XIFREDA, C. C.; MALLO, A. C. El Género Cunila (Lamiaceae, Mentheae) en Argentina. **Darwiniana**, v. 44, v. 1, p. 298-308, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26505897_El_genero_Cunila_Lamiaceae_Mentheae_en_Argentina. Acesso em: 06 de Junho de 2023.

YANG, Z. *et al.* Chrysin attenuates carrageenan-induced pleurisy and lung injury via activation of SIRT1/NRF2 pathway in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 836, p.83-88, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30118661/>. Acesso em: 11 de Novembro de 2023.

ZOUINE, N. *et al.* A Comprehensive Review on Medicinal Plant Extracts as Antibacterial Agents: Factors, Mechanism Insights and Future Prospects. **Scientific African**, p. e02395, 2024.