

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos



Tese

Estudo do potencial farmacológico do óleo essencial das folhas da
***Eugenia uniflora* L.**

Francine Novack Victoria

Pelotas, 2013.

FRANCINE NOVACK VICTORIA

**Estudo do potencial farmacológico e toxicológico do óleo essencial das
folhas da *Eugenia uniflora* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Comissão Orientadora: Prof. Dr. Eder João Lenardão

Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago

Pelotas, 2013.

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

V642a Victoria, Francine Novack

Avaliação farmacológica do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* / Francine Novack Victoria ; orientador Eder João Lenardão; co-orientador Lucielli Savegnago. - Pelotas, 2013.- 121 f. ; il.- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Eugenia uniflora 2.Óleo essencial
3.Estresse oxidativo I.Lenardão, Eder João(orientador) II.Título.

CDD 634.4

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eder João Lenardão – Orientador (CCQFA/UFPeI)

Prof^a. Dr^a Lucielli Savegnago – Co-orientadora (CDTec/UFPeI)

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (CCNE/UFSM)

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi (DCTA/ UFPeI)

Prof^a. Dr^a Marina Progol (UNIPAMPA)

Dr. Julio Vinuesa (CCQFA/UFPEL)

Agradecimentos

A Deus, pela força, esperança e sabedoria para concluir meus objetivos;

Aos meus pais, Francisco e Margarida, pelo amor, carinho, amizade, paciência, incentivo e confiança, nesse e em todos os momentos da minha vida;

Ao meu irmão, João Luís, pela amizade, incentivo, companheirismo, carinho e amor.

Ao Wagner, pelo amor, paciência, amizade, carinho, incentivo e momentos de descontração que me deram força para seguir.

Ao meu orientador, Prof. Eder Lenardão, um exemplo de profissional, pela orientação, paciência, amizade, carinho e conhecimento transmitido. Agradeço principalmente, pela amizade e apoio recebido no início do doutorado.

A minha co-orientadora, Lucielli Savegnago, pela confiança, carinho, amizade, compreensão, dedicação, parceria e conhecimento compartilhado. E, principalmente por me mostrar que o sucesso só vem quando as coisas são feitas com amor.

Aos colegas do GPN, Mariana, Débora, Roberta, Angela, Arthur, Rodolfo e Robertinha, pela ajuda, amizade e momentos de descontração, e em especial à Micheli, pelo apoio, amizade, carinho, pelas longas conversas, pelo ombro amigo e pelos momentos de “loucura”, que foram essenciais durante este período. Pois, acabo essa etapa colecionando amigos e, não meros colegas.

Aos colegas do LASOL, em especial à Loren e a Vanessa, pela amizade, carinho e companheirismo.

Aos professores Raquel Guimarães Jacob, Diego Alves e Gelson Perin, pela ajuda, atenção e acessibilidade.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelo conhecimento transmitido.

Ao Biotério Central da UFPel, por cuidar dos animais, permitindo assim a realização de nossos experimentos.

Aos laboratórios do CDTEC, LARSOL, MICROBIAL, Micologia, por permitirem o desenvolvimento de partes deste trabalho.

Resumo

VICTORIA, Francine Novack. **Estudo do potencial farmacológico e toxicológico do óleo essencial das folhas da *Eugenia uniflora* L.** 2013. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção e a manifestação de espécies reativas e a habilidade do sistema biológico de detoxificar rapidamente os intermediários reativos ou de reparar os danos causados. Atualmente mais de 100 doenças nas quais o estresse oxidativo está implicado são conhecidas, nesse sentido é de grande interesse a busca por novas moléculas com potencial antioxidante, entre as pesquisas os produtos naturais e, mais especificamente, os óleos essenciais se destacam, como o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*, que possui atividade antinociceptiva, antibacteriana e antifúngica, descritas na literatura. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante, antidepressivo, antimicrobiano, genotóxico e capacidade de reversão de um dano induzido por paracetamol do óleo essencial das folhas de *E. uniflora*. Os resultados demonstraram que o óleo essencial apresenta atividade antioxidante frente a radicais livres sintéticos, efeitos na peroxidação lipídica no fígado e estruturas cerebrais de camundongos, o óleo essencial também foi capaz de reverter o dano hepático induzido por uma superdosagem de paracetamol e não foi genotóxico. Além disso, o óleo apresentou efeito antidepressivo com possíveis envolvimento dos sistemas serotoninérgicos e adrenérgicos. Logo, o óleo essencial apresentou potencial farmacológico e não apresentou efeitos tóxicos, estes resultados sugerem que o óleo essencial das folhas de *E. uniflora* possui potencial para o uso na indústria farmacêutica.

Palavras-chaves: *Eugenia uniflora*, óleo essencial, estresse oxidativo, depressão.

ABSTRACT

VICTORIA, Francine Novack. **Study of pharmacological potential of *E. uniflora* leaves essential oil. 2013.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Oxidative stress represents an imbalance between the production and manifestation of reactive oxygen species and a biological system's ability to readily detoxify the reactive intermediates or to repair the resulting damage, and currently is involved in more than 100 diseases. In this way is of great interest the search for new molecules with antioxidant potential, between these researches natural products, especially essential oils stand, like *Eugenia uniflora*. The *E. uniflora* essential oil possesses antinociceptive, antibacterial and antifungal activities. The goal of this work was evaluated the antioxidant, antimicrobial, genotoxic, reversed effect in a damage caused by acetaminophen and antidepressant effect of the *E. uniflora* EO. The results demonstrated that this EO present antioxidant effects, reduced lipid peroxidation in liver and brain structures, furthermore the EO was able to reversed the hepatic damage caused by a super dose of acetaminophen and was not genotoxic in blood and marrow cells of mice. The EO presents antidepressant effect with possible involvement of serotonergic and adrenergic systems. So, in this study the *E. uniflora* EO possesses pharmacological effects without toxicity. These findings suggest that the EO of the leaves of *E. uniflora* may have the potential for use in the pharmaceutical industry.

Key-words: *Eugenia uniflora*, essential oil, oxidative stress, depression.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do estresse oxidativo..	15
Figura 2: Fontes de EROs e a resposta celular.....	15
Figura 3: Cadeia transportadora de elétrons.....	16
Figura 5: Etapas do processo de peroxidação lipídica	19
Figura 6: Estrutura química de alguns compostos fenólicos	24
Figura 7: Biotransformação do paracetamol.....	27
Figura 8: Classificação da dor quanto à origem	32
Figura 9: Estruturas químicas de alguns compostos presentes em óleos essenciais.....	36
Figura 10: Principais compostos encontrados no óleo essencial das folhas de <i>E. uniflora</i>	41
Figura 11: Fluxograma dos experimentos realizados no trabalho.	46
Figura 12: (A) – Neutralização do radical ABTS, (B) – Neutralização do radical DPPH, (C) – Redução do íon férrico.	98

Lista de Abreviaturas

OE – óleo essencial

CG/MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

ERs – espécies reativas

EROs – espécies reativas de oxigênio

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

ERSs – espécies reativas de enxofre

ERCs – espécies reativas de carbono

NADH – nicotinamida adenine dinucleotídeo

ATP – adenosina trifosfato

GSH – glutationa

CAT – catalase

SOD – superóxido dismutase

GPX – glutationa peroxidase

GST – glutationa – S-transferase

GR – glutationa redutase

NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAPBQI – *N*-acetil – *p* – benzoquinone imina

DNA – ácido desoxirribonucleico

MDA – malondialdeído

CaMKII – cálcio calmodulina cinase II

PKC – proteína cinase C

PKA – proteína cinase A

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno

CREB - proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

NGF – fator de crescimento nervoso

AINES – anti-inflamatório não esteroide

ISSO – International Standard Organization

DPPH – 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfônico)

FRAP – potencial redutor do íon férrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

δ -ALA-D – δ - aminolevulinato desidratase

IC₅₀ – concentração que inibe 50%

DL₅₀ – dose letal para 50 % dos animais

ID₅₀ – dose que inibe 50 % do efeito

I_{max} – inibição máxima

AST – aspartato aminotransferase

ALT – alanina aminotransferase

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Estresse Oxidativo	14
2.2 Depressão	27
2.3 Dor e Nocicepção	30
2.4 Óleos essenciais	35
2.5 <i>Eugenia uniflora</i> L.	38
3. JUSTIFICATIVA	42
4. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo Geral	43
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	45
5.1 Óleo essencial das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.: propriedades antioxidantes e antimicrobianas	47
5.2 Avaliação do potencial genotóxico e hepatoprotetor do óleo essencial das folhas de <i>Eugenia uniflora</i>	55
5.3 Envolvimento dos sistemas serotoninérgico e adrenérgico no efeito antidepressivo do óleo essencial das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e análises complementares sobre a atividade antioxidante	78
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	97
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
Anexo 1: Participação em outros trabalhos, durante o período 2010 – 2013.	123

1. INTRODUÇÃO

Os organismos aeróbios produzem espécies derivadas do oxigênio fisiológica e metabolicamente, porém uma parte destas espécies pode ser tóxica, através de interações oxidativas com biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que podem levar a danos e morte celular (MORRISEY; O'BRIEN, 1998). Além disso, todos os organismos aeróbios possuem defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas responsáveis por remover ou reparar danos causados pelas espécies reativas nas moléculas. O balanço entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes é crítico para o funcionamento e sobrevivência de organismos aeróbios e o desequilíbrio entre essas espécies é chamado de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006a).

Atualmente mais de 100 doenças nas quais o estresse oxidativo está implicado são conhecidas. Na maioria dos casos os radicais livres são formados como consequência de um dano tecidual, como nas doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, doenças coronárias, depressão, doenças inflamatórias e epilepsias (HALLIWELL, 2006b).

Nesse sentido é de grande interesse a busca por novas moléculas com potencial antioxidante. Entre as pesquisas nessa área os produtos naturais e, mais especificamente, os óleos essenciais se destacam como potenciais agentes antioxidantes, devido principalmente à presença de compostos polifenólicos, fenólicos e terpênicos (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais (OEs), também chamados de óleos voláteis, são líquidos oleosos obtidos de diferentes partes das plantas (flores, folhas, sementes, frutos, raízes, etc.) (BURT et al., 2004). Na natureza os OEs possuem um papel importante na proteção das plantas agindo como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra alguns animais herbívoros (BAKKALI et al., 2008).

O conhecimento sobre os métodos de extração e aplicações medicinais dos OEs foi introduzido na ciência no século X (PERRY et al., 2006). Embora os OEs tenham sido utilizados por séculos na medicina tradicional, as bases

científicas para a sua utilização ainda são limitadas e tanto a farmacologia como a composição química dos OEs, permanece parcialmente inexplorada.

Os OEs são uma mistura complexa de compostos, que podem conter de 20 – 60 componentes em diferentes concentrações, geralmente caracterizados por dois ou três componentes majoritários, encontrados em altas concentrações (20 – 70 %), comparado com a quantidade dos outros compostos presentes. A composição química dos OEs inclui dois grandes grupos: os terpenos e terpenóides e os constituintes alifáticos e aromáticos (BAKKALI et al., 2008).

Entre as muitas plantas com potencial biológico no Brasil, as frutíferas nativas do sul do Rio Grande do Sul, como a pitanga, a guabiroba e o araçá destacam-se. A *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) é uma árvore nativa das regiões sul e sudeste do Brasil (LIMA et al., 2005). O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 encontram-se no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais. Dentro deste gênero está a espécie *Eugenia uniflora* L., comumente conhecida como pitangueira, que se apresenta como um arbusto ou árvore semidecídua, de 4 a 10 m de altura, copa estreita, de tronco liso de cor pardo clara. As folhas são simples, de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico. As flores são de cor branca e os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, brilhantes e de cor vermelha, amarela ou preta, com polpa carnosa e agri-doce, contendo 1 a 2 sementes (LORENZI; MATOS, 2002). Suas folhas são popularmente usadas por seus efeitos anti-hipertensivos, diuréticos, adstringentes, antipiréticos e para o tratamento de distúrbios digestivos (FIUZA et al., 2008).

A seguir, será apresentada uma breve revisão da literatura sobre estresse oxidativo, depressão, dor, óleos essenciais e *Eugenia uniflora* L., a fim de contextualizar o trabalho aqui descrito e orientar o leitor. Após, serão apresentados a justificativa, os objetivos, os resultados e a conclusão deste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse Oxidativo

A teoria do estresse oxidativo originalmente foi proposta por Harman et al. (1950), esta postulava que os radicais livres de oxigênio endógenos formados no processo metabólico normal acumulavam-se e por oxidação causavam dano na molécula de DNA.

Em 1991, Sies descreveu o estresse oxidativo como um desequilíbrio no balanço entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes, em favor das primeiras, que pode levar a danos nas biomoléculas. Sendo assim, o aumento dos danos oxidativos resulta no aumento do estresse oxidativo e na incapacidade de reparar ou repor biomoléculas oxidadas.

O estresse oxidativo pode ser promovido pela diminuição nas defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas ou também pelo aumento na produção de espécies reativas (ERs) (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As ERs podem ser de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs), de enxofres (ERSs) e de carbono (ERCs), sendo as principais, as EROs. As espécies reativas (ERs) podem gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e da reação com as biomoléculas (JOSEPHY, 1997, TIMBRELL, 2000).

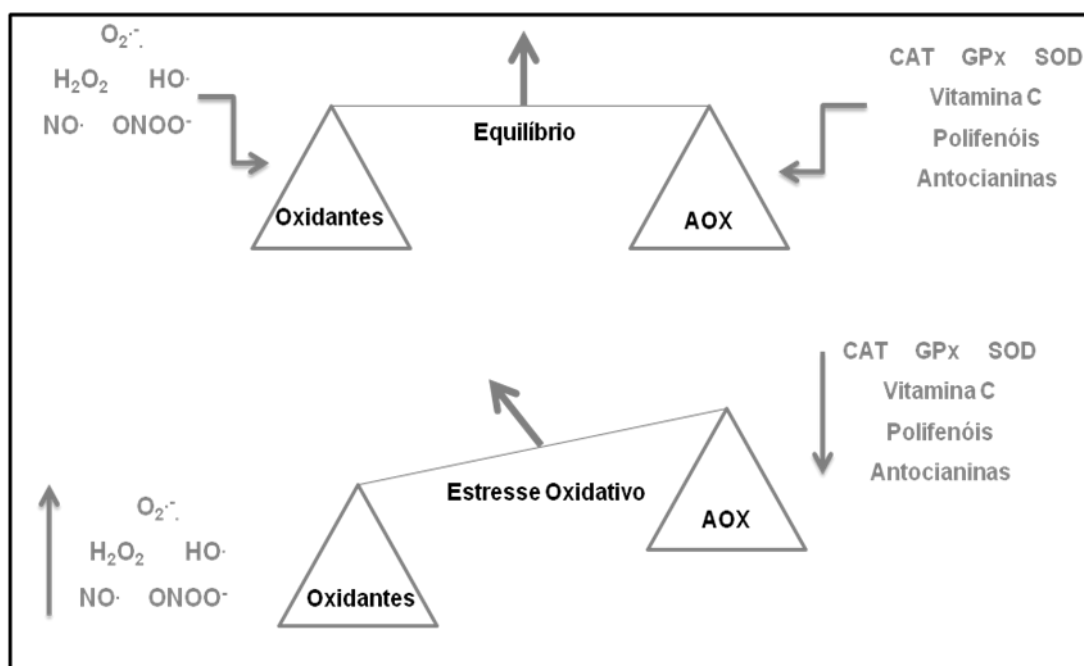


Figura 1: Representação esquemática do estresse oxidativo. Espécies oxidantes: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), radical óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Espécies antioxidantes: catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD). Adaptado de Halliwell (2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser endógenas exógenas (Fig. 2). As fontes endógenas são produtos normais do metabolismo celular, podendo ser benéficas ou não dependendo da concentração. As fontes potenciais destas espécies no organismo são a respiração mitocondrial, enzimas lipoxigenases e cicloxigenases (via do ácido araquidônico), citocromo P450, óxido nítrico sintase, xantina oxidase, NAD(P)H oxidases, peroxidases e enzimas de neutrófilos e macrófagos (ALEXANDER, 1983, BABIOR et al., 1978, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em relação às fontes exógenas de EROs pode-se citar a radiação solar, agentes químicos e metais pesados, presentes frequentemente no ambiente (OSTHOFF et al., 1997).

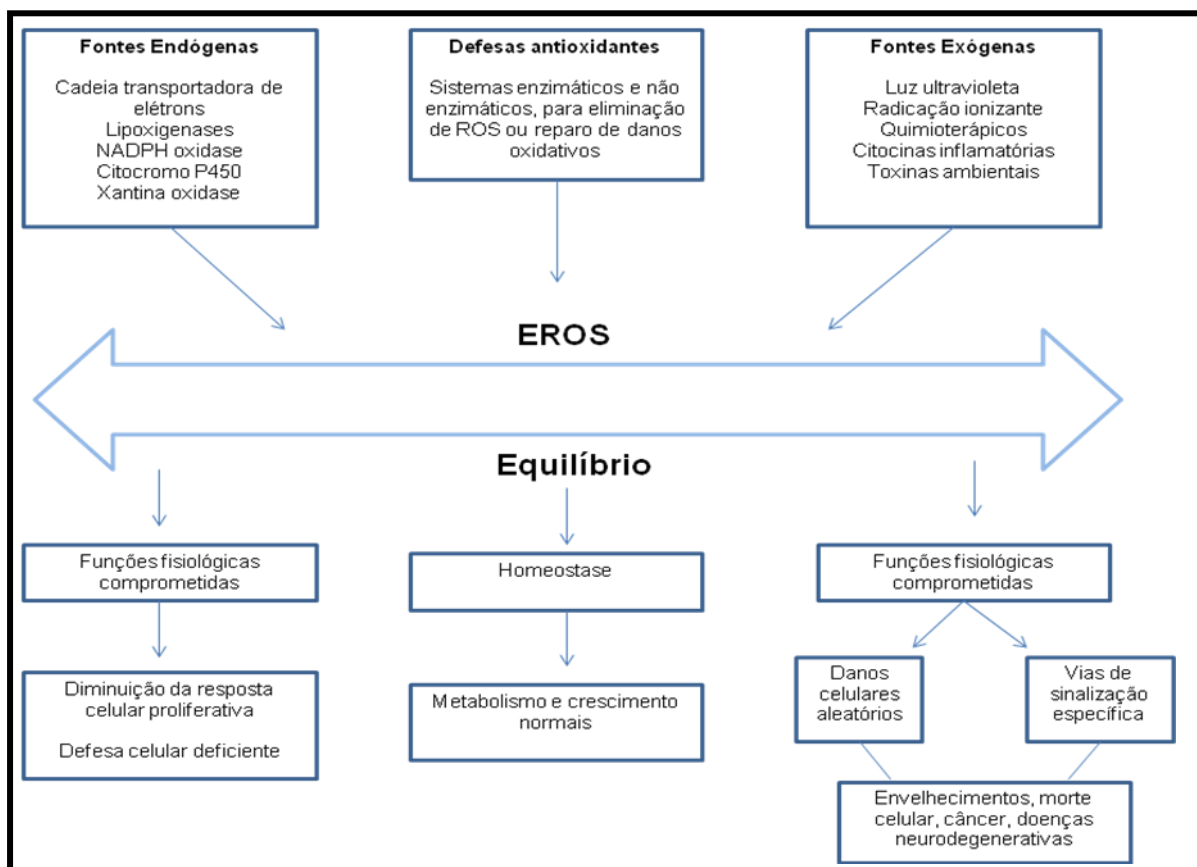


Figura 2: Fontes de EROs e a resposta celular (Adaptado de Finkel; Holbrook, 2000)

Quando presentes em concentrações normais (a concentração varia com o tipo celular), as EROs são importantes para a defesa contra agentes

infecciosos, sistemas de sinalização celular, como a ativação da guanilato ciclase, com a formação do segundo mensageiro da guanosina monofato cíclica e indução da divisão celular (VALKO et al., 2006).

A maior parte das espécies reativas é produzida durante a redução da molécula de oxigênio (O_2) em água (H_2O) na cadeia transportadora de elétrons, que ocorre na membrana interna das mitocôndrias. As mitocôndrias, através de uma sequência de reações de oxidação e redução (cadeia transportadora de elétrons), reduzem em aproximadamente 95 % o O_2 , através de um processo catalisado por diversos sistemas enzimáticos, como: NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, citocromo bc_1 e citocromo oxidase (LEHNINGER, 2011). Porém, uma parte do O_2 não é reduzida e leva à formação de espécies reativas a partir do $O_2^{\cdot-}$. O H_2O_2 é formado durante a β -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos e assim como o $O_2^{\cdot-}$, pode levar à formação de outros radicais livres (Fig. 3), como por exemplo, o radical $HO^{\cdot}$, uma das espécies radicalares mais reativas no nosso organismo.

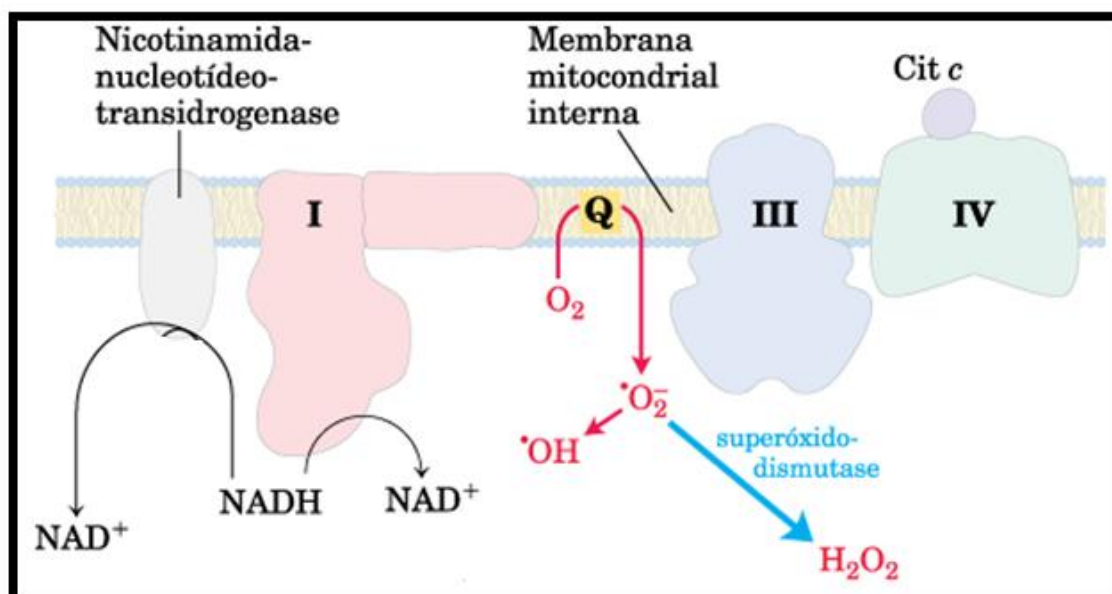


Figura 3: Cadeia transportadora de elétrons – Produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). NADH – nicotinamida desidrogenase, Q – ubiquinona, Cit c- citocromo C. Adaptado de Nelson; Cox (2011).

As ERs podem ser radicalares (radicais livres) ou não radicalares, e as principais ERs envolvidas com o estresse oxidativo são: o radical ânion

superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (HALLIWELL, 2006a).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pela redução do oxigênio, através de reações de auto-oxidação na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (MANDELKER, 2008). Quando este radical entra em contato com outras espécies radicalares, como por exemplo, com o radical óxido nítrico (NO), reage, ocasionando a formação de peroxinitro ($ONOO^-$) (Fig. 4), uma espécie altamente reativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o íon ferroso e peróxido de hidrogênio, através da reação de Haber-Weiss (HABER WEISS, 1932).

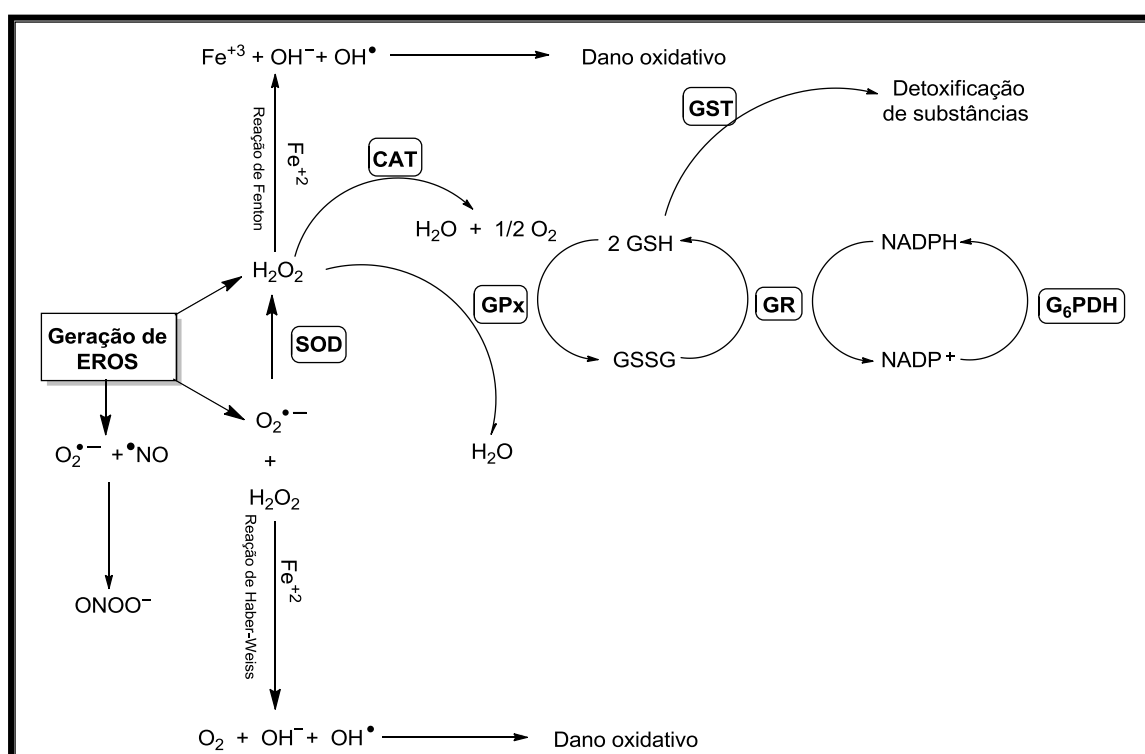


Figura 4: Produção de espécies reativas. ROS – espécies reativas de oxigênio; Radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), radical óxido nítrico ($\cdot NO$) e peroxinitrito ($ONOO^-$); catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutatona (GSH), glutatona oxidada (GSSG), glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase (NADPH).

O radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) é uma espécie altamente reativa, produzido *in vivo* por diversos processos e, uma vez formado, reage com qualquer molécula presente no seu local de formação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006a). Ao

reagir com o DNA, leva à formação de uma variedade de produtos, incluindo bases púricas e pirimídicas modificadas (HALLIWELL; ARUOMA, 1991). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma ERO não radicalar, é formado pela dismutação do radical ânion superóxido (Fig. 4) e por ação de algumas enzimas, como a xantina oxidase. Apesar do H_2O_2 não ser um radical, ele pode desencadear reações que levam à formação de radicais livres. Além disso, esta espécie pode degradar hemeproteínas, como a mioglobina e hemoglobina, liberando ferro. A reação de H_2O_2 com metais (Fe^{+2}) é conhecida como a reação de Fenton, que forma $HO\cdot$ (Fig. 4) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003).

As espécies reativas e os radicais livres, quando em excesso, são extremamente reativos e citotóxicos em todos os organismos. Eles podem reagir com as biomoléculas do organismo, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, causando danos moleculares severos, que podem ser irreparáveis e causar assim a morte celular (SCANDALIOS, 2005).

As membranas biológicas apresentam uma estrutura geral comum, constituída de uma bicamada lipídica, formada principalmente por fosfolipídeos, os quais estão associados às proteínas. As proteínas presentes na membrana celular são responsáveis pelo transporte de moléculas específicas através da bicamada lipídica, assim como podem reagir como catalisadores de reações químicas associadas às membranas, como a síntese de ATP (ATP sintase) (ALBERTS et al., 1994).

O processo de oxidação de lipídeos promovido por EROs e radicais livres é denominado de peroxidação lipídica. As reações da peroxidação lipídica envolvem três fases: iniciação, propagação e término (Fig. 5).

Na fase de iniciação, o hidrogênio do ácido graxo insaturado (LH) do fosfolipídio de membrana é removido por uma ERO produzindo o radical lipídico $L\cdot$. Em seguida, na fase de propagação, o radical lipídico formado na reação anterior reage com o oxigênio molecular, formando o radical peroxila ($LOO\cdot$), este radical pode dar início a um novo processo de remoção de hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical $L\cdot$ e hidroperóxido ($LOOH$). Estes radicais peroxilas formados podem facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo maiores danos (BARREIROS et al., 2006). Através de outras reações como, por exemplo, as catalisadas por

metais de transição como o cobre e o ferro, o hidroperóxido lipídico pode formar $\text{LOO}^\bullet$ e o radical alcóxila ($\text{LO}^\bullet$), que participam na propagação da cadeia radicalar. A maioria destas reações são degradativas e produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares (VALKO et al., 2006). Estes produtos são utilizados para monitorar o processo de peroxidação lipídica em condições fisiológicas, sendo o malondialdeído (MDA), uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), comumente dosado.

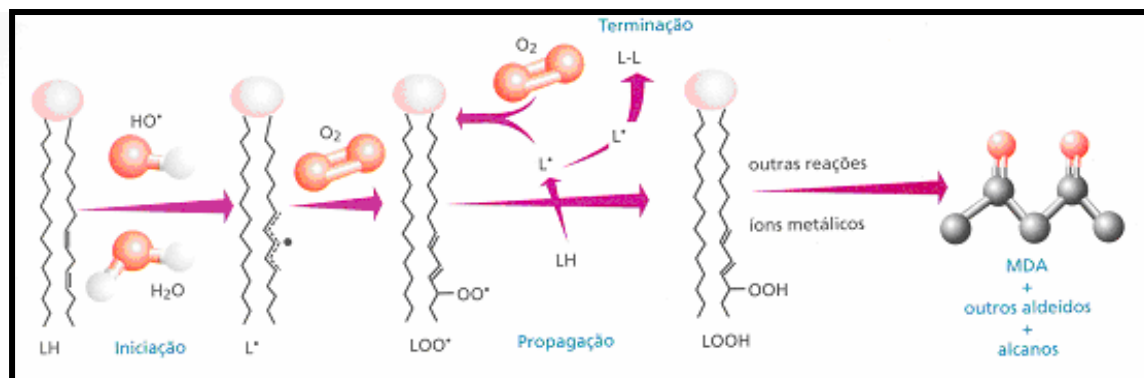


Figura 5: Etapas do processo de peroxidação lipídica (OGA, 2003). LH – lipídeo, $\text{L}^\bullet$ – radical lipídico, $\text{LOO}^\bullet$ – radical peróxido, LOOH – hidroperóxido, MDA – malondialdeído.

Quando as EROs reagem com os ácidos graxos insaturados, modificam os lipídeos e as membranas perdem as suas características arquitetônicas alterando a sua semipermeabilidade, o que favorece a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos das células, provocando a ruptura, lise e necrose (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

As proteínas podem ser diretamente oxidadas por todas as espécies reativas de oxigênio ou também ser alvo dos produtos da peroxidação lipídica. As modificações das proteínas basicamente são iniciadas pelo radical $\text{OH}^\bullet$, contudo a continuidade do processo de oxidação é determinada pela disponibilidade de oxigênio (O_2) ou de sua forma protonada. Coletivamente, as EROs conduzem à oxidação de resíduos de aminoácidos, o que pode resultar na fragmentação das proteínas (BERLETT; STADTMAN, 1997). O radical ânion superóxido, especificamente ataca os grupamentos 4Fe-4S, promovendo desta forma, o aumento da liberação de ferro e inativação da proteína (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A concentração de ferro livre tem sido relacionada com lesões oxidativas provocadas nos vacúolos, proporcionando a fragmentação

desta organela e aumentando a sensibilidade das células a várias condições de estresse (SRINIVASAN et al., 2000).

O peróxido de hidrogênio inativa enzimas através da oxidação de grupamentos tióis em resíduos de cisteína presentes nos sítios ativos, levando à formação de ligações dissulfeto (S-S). Isso acontece na oxidação da cisteína, que pode levar à formação reversível de dissulfetos nos grupamentos tióis das proteínas (-SH), ou com tióis de baixo peso molecular, especialmente a glutathiona (GSH) (VALKO et al., 2007). Outro dano causado às proteínas é a inserção de grupos carbonílicos (CO) nas cadeias laterais de proteínas. O peróxido de hidrogênio tem a capacidade de provocar a oxidação de alguns resíduos específicos de aminoácidos, como os citados acima e da histidina, levando freqüentemente à formação dos grupamentos carbonila nas suas cadeias laterais, como também à quebra da cadeia polipeptídica, ao atacar resíduos de prolina, aspartato e glutamato (STADTMAN, 1992, LEVINE et al., 1994).

Os agentes oxidantes são capazes de provocar lesões na molécula de DNA genômico e mitocondrial. Esta oxidação do DNA pode atingir tanto suas bases nitrogenadas como as moléculas de açúcar (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001). Entre as lesões oxidativas mais perigosas, a modificação das bases nitrogenadas apresenta-se em uma posição de destaque, pois frequentemente está associada à formação de mutações e perda da integridade do DNA (HALLIWELL; ARUOMA, 1991). As mutações permanentes resultantes dos danos oxidativos são o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e no envelhecimento (VALKO et al., 2006).

Entre os danos causados por EROs no DNA temos a quebra das fitas duplas e simples e a formação de sítios abásicos (sítios com perda de bases nitrogenadas). As lesões no DNA podem resultar tanto na inativação quanto na ativação da sua transcrição, replicação de erros e instabilidade genômica. Todas estas alterações podem ser associadas com a carcinogênese (MARNETT, 2000, VALKO et al., 2006).

O radical hidroxil, ao ser gerado pela reação de Fenton/Haber-Weiss (Fig. 4), é capaz de reagir com todos os componentes da molécula do DNA, lesionando tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxiribose. Dentre as

lesões no DNA, a formação de 8-hidroxi-desoxiguanosina é a mais estudada. A importância desta lesão encontra-se no fato de ser facilmente detectada, podendo ser aplicada como um marcador de lesão oxidativa e também de carcinogênese (VALKO et al., 2006).

No organismo humano, as ERs são neutralizadas por um elaborado sistema de defesa antioxidante, constituídos de enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx), além de inúmeros sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticas que incluem a glutatona (GSH), algumas vitaminas (A, E, C) e compostos fenólicos (ALEXI et al., 1998, GIANNI et al., 2004).

As células eucarióticas, diante da grande diversidade de produção das EROs, desenvolveram um elaborado mecanismo de defesa celular denominado sistema de defesa antioxidante. O termo antioxidante é utilizado para definir o conjunto enzimático ou não de sistemas que protegem as macromoléculas ou estruturas celulares contra os efeitos potencialmente danosos de reações que promovem a oxidação.

A exposição a radicais livres, provenientes de diversas fontes, conduz o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa (CADENAS, 1997), tais como: mecanismos de prevenção, de reparo, físicos e as defesas antioxidantes (VALKO et al., 2007). Em condições normais, há um equilíbrio entre as reações que envolvem os oxidantes (EROs) e os antioxidantes, sendo mantidas as condições de vida. Entretanto, na ocorrência de um excesso de EROs e/ou uma deficiência de antioxidantes é estabelecido o processo de estresse oxidativo, podendo culminar com os efeitos nocivos dos radicais livres (DRÖGE, 2002).

Quando o balanço oxidativo celular é alterado há uma resposta inicial e rápida, resultado da ativação de todo um sistema de proteção pré-existente, bem como a ativação de um mecanismo de tradução de sinais que levará à ativação da resposta secundária caracterizada pela síntese *de novo* de proteínas e moléculas de proteção celular (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

Um antioxidante é definido como qualquer substância, que quando presente em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidado, diminui

ou inibe significativamente a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989, HALLIWELL, 2006c, SIES, 1991). Os antioxidantes podem proteger o corpo humano do ataque de ERs e radicais livres, retardando o progresso de muitas doenças crônicas, assim como da peroxidação lipídica.

O sistema de defesa antioxidante é constituído de sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. Os primeiros incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutational peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), enquanto que os não enzimáticos são representados por vitamina C, vitamina E, glutational (GSH), carotenóides e flavonóides (VALKO et al., 2007).

Com referência aos antioxidantes enzimáticos, a superóxido dismutase desempenha importante papel, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Fig. 3, pag. 10). Em tecidos animais, a SOD está presente na forma de diferentes isoenzimas, que possuem sítios ativos com átomos de manganês (Mn-SOD) presente na membrana mitocondrial e cobre e zinco (CuZnSOD), presentes no espaço intermembrana e no resto da célula (FRIDOVICH, 1995).

A enzima catalase, presente nos peroxissomos, participa da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular com alta taxa de *turnover* (uma molécula de catalase pode converter aproximadamente seis milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio por minuto) (Fig. 3, pag. 10) (HALLIWELL, 2006a).

A glutational peroxidase, conhecida como uma enzima selênio-dependente, pois contém em seu sítio ativo o átomo de selênio, age em conjunto com a glutational (Fig. 3), desempenhando um dos mais importantes mecanismos de defesa antioxidante; catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da oxidação da glutational (GSSG) (VALKO et al., 2006).

A glutational (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH) é a principal defesa antioxidante não enzimática no organismo humano. Esta é um tiol tripeptídeo de baixo peso molecular encontrado abundantemente no meio intracelular. Esta molécula possui grande importância em diversos processos intracelulares como, por exemplo, transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos

nucleicos, modulação da atividade enzimática, metabolismo de xenobióticos e proteção contra substâncias carcinogênicas e espécies reativas de oxigênio (DOUGLAS, 1987, SIES et al., 1979).

A utilização da GSH, pela enzima GPx resulta em sua oxidação para a forma de dissulfeto (GSSG). A GSH oxidada pode ser regenerada através de um sistema alternativo de reciclo catalisado pela enzima glutathione redutase, (GR) dependente de NADPH, formado na via das pentoses, que serve como poder redutor (ALONSO-MORAGA et al., 1987; TUGGLE; FUCHS, 1986).

As defesas antioxidantes exógenas são provenientes principalmente da alimentação. O consumo de frutas e legumes tem sido associado com a diminuição do risco de doenças crônicas, incluindo a aterosclerose coronária (RIMM, 1996). Estudos epidemiológicos demonstram uma associação inversa entre o consumo de frutas e legumes e a mortalidade devido a doenças relacionadas com a idade, como doenças coronárias e câncer e esses efeitos podem ser atribuídos à atividade antioxidante (EBERHARDT, 2000, GANESAN et al., 2011).

Os principais compostos bioativos de fontes naturais são os compostos fenólicos e flavonóides, os quais estão relacionados com benefícios à saúde. Os compostos fenólicos de origem natural são produtos do metabolismo de vegetais e tem como função a proteção da planta contra situações adversas. Uma grande variedade de compostos fenólicos bioativos que possuem um ou mais anéis aromáticos são encontrados naturalmente em plantas. As substâncias fenólicas mais simples incluem os monofenóis (um anel benzênico), o grupo dos ácidos cinâmicos e os flavonóides e seus derivados glicosídicos (Figura 6) (GULÇIN, 2012).

A atividade antioxidante que os compostos fenólicos podem exercer depende de fatores como a concentração e o tipo de composto presente. A ação antioxidante também pode ser resultado de um sinergismo com outros compostos (GULÇIN, 2012).

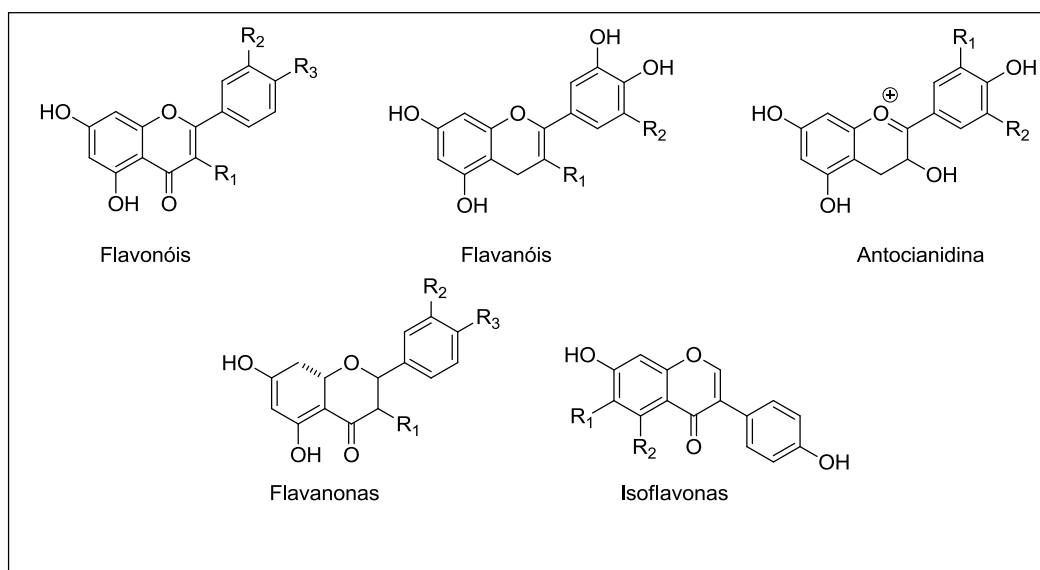


Figura 6: Estrutura química de alguns compostos fenólicos

Estudos recentes sugerem o envolvimento do estresse oxidativo com as principais causas de lesão tecidual (LOGUERCIO; FREDERICO, 2003). Muitas evidências suportam o envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento e patologia de diversas doenças, como o câncer, artrites, doenças cardiovasculares, aterosclerose, diabetes mellitus, envelhecimento celular, doenças hepáticas, doenças neurodegenerativas e inflamatórias e depressão (CHUNG et al., 1999, LEE et al., 1999, VALKO et al., 2007). Acredita-se que em muitas destas doenças o estresse oxidativo possua um papel periférico, porém em outras as ERs possuem um papel central em um variado número de reações biológicas fundamentais, sugerindo que muitas doenças e processos degenerativos possam estar associados com a superprodução de ERs, em especial as espécies reativas de oxigênio (EROs) (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

O papel das espécies reativas em doenças inflamatórias ainda não está claro, visto que estas espécies podem contribuir para o entendimento do envolvimento das doenças inflamatórias com o aumento do risco de câncer (BARTSCH; NAIR, 2004, HALLIWELL, 2002, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estas espécies podem, todavia, apresentar ação anti-inflamatória, através da modulação da função de linfócitos (HALLIWELL, 2006c, MALMBERG et al., 2001, RAHMAN et al., 2006, VAN DER VEEN et al., 2000).

Cabe salientar o papel do estresse oxidativo nas doenças hepáticas, as quais são um problema de saúde pública mundial. No meio ambiente e ocupacionalmente o ser humano está exposto a uma diversidade de compostos hepatotóxicos, como alguns medicamentos (acetoaminofeno - paracetamol), tintas e seus derivados (2-nitropropano), reagentes químicos (tetracloreto de carbono, CCl_4) e na exposição ao cigarro (2-nitropropano). Evidências crescentes relacionam as EROs com a cascata de eventos que regulam o início e a progressão de doenças hepáticas, independente do agente que a originou (LOGUERCIO; FREDERICO, 2003, VITAGLIONE et al., 2004). Assim o uso de terapias antioxidantes, de compostos que interferem no sistema de metabolização (sistema P-450) do agente hepatotóxico e aumentam a atividade de sistemas enzimáticos de defesas são as opções usadas no tratamento da hepatotoxicidade (WEBER et al., 2003).

No decorrer dos processos de biotransformação de xenobióticos são produzidos diversos intermediários reativos potencialmente tóxicos. Estas reações podem resultar em baixos níveis de exposição ao xenobiótico. O paracetamol, por exemplo, é efetivo quando consumido de acordo com as recomendações (1–4 g / dia), porém uma super dosagem deste fármaco pode levar a um dano hepático. A hepatotoxicidade do paracetamol está relacionada com a sua biotransformação (Fig. 7). Em doses normais, 2% do paracetamol é excretado na urina, o remanescente é metabolizado no fígado por dois mecanismos: 90 % por conjugação (glicoronidação e sulfonação) (FORREST et al., 1982) e aproximadamente 5 - 9 % sofre metabolização por reações de fase 1 (grupos polares são adicionados por oxidação, redução ou hidrólise). No caso do paracetamol, ocorre uma conversão oxidativa gerando o metabólito tóxico *N*-acetilbenzoquinonaimina (NAPQI) (CHEN et al., 1988). Altas doses de paracetamol levam à saturação do processo de biotransformação pelas vias do ácido glicurônico e pela sulfatação, sobrecarregando o sistema do citocromo e aumentando a produção deste metabólito tóxico (MAKIN; WILLIAMS, 1994).

O NAPQI é uma espécie altamente reativa que pode agir como um eletrófilo ou um oxidante, sendo rapidamente conjugada com a glutathione intracelular, reação catalisada pela enzima glutathione S-transferase (GST), a fim eliminar o NAPQI de forma atóxica pelos rins (MITCHEL et al., 1973).

Entretanto, as reservas de GSH são limitadas, sendo esgotadas na tentativa de detoxificar o NAPQI produzido em excesso (MITCHEL et al.,1973). Quando as reservas de GSH estão reduzidas em torno de 70–80%, a capacidade de detoxificação do fígado fica excedida e o NAPQI se acumula, interagindo com os hepatócitos e destruindo-os (PRESCOTT, 1983). Na ausência de GSH o NAPQI começa a se ligar em resíduos de cisteína de macromoléculas dos hepatócitos, gerando adutos (PUMFORD et al., 1989), os quais são o processo inicial e irreversível no desenvolvimento dos danos celulares (GIBSON et al., 1996).

O esgotamento de GSH contribui para o estresse oxidativo celular (JAESCHKE et al., 2003), quando o NAPQI se liga a alvos celulares críticos, como as proteínas mitocondriais, ocorrendo disfunções mitocondrial e perda de ATP celular (HARMAN et al., 1991). Os hepatócitos sofrem subsequente falência energética, alteração na homeostase do cálcio, depleção de ATP, dano ao DNA e modificação de proteínas intracelulares. Estes eventos levam à morte celular por necrose (JAESCHKE; BAJT, 2006).

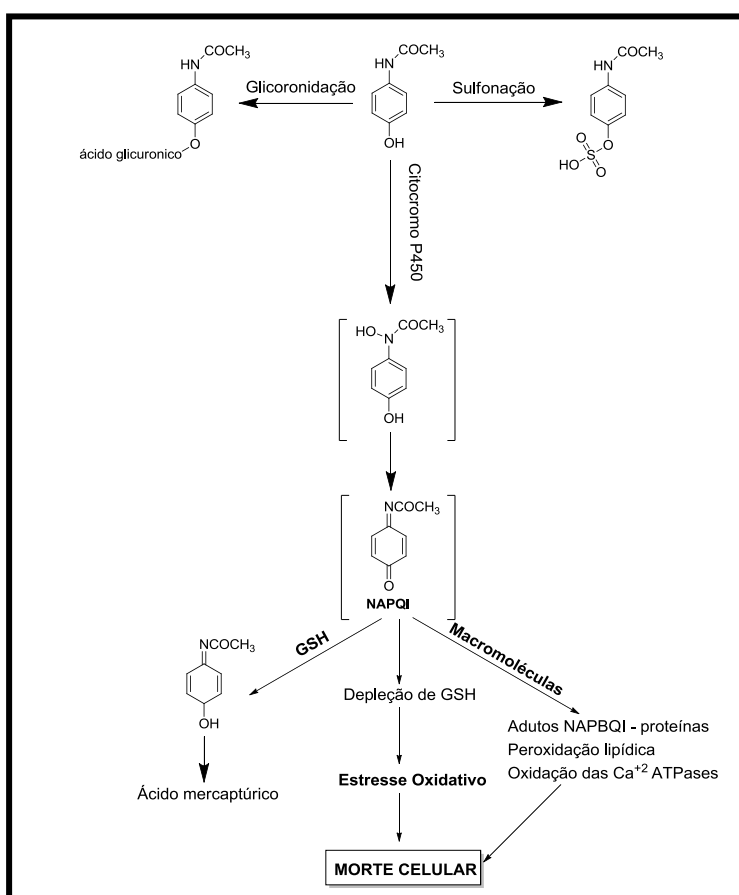


Figura 7: Biotransformação do paracetamol. NAPQI – *N*- acetilbenzoquinonaimina, GSH – glutationa. Fonte: MAKIN; WILLIAMS, 1994.

Existem diversas doenças neurológicas nas quais o estresse oxidativo pode estar envolvido, como: doença de Parkinson, doença de Alzheimer, isquemia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças inflamatórias, fenilcetonúria, epilepsia e a depressão (EREN et al., 2007, DEON, et al., 2006, REZNICK; PACKER, 1993, SIRTORI et al., 2005,).

O reconhecimento do envolvimento das ERs em diversas enfermidades tem levado à utilização de terapias antioxidantes (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Nos últimos anos, existe um grande interesse na identificação de novos antioxidantes de fontes naturais, especialmente derivados de plantas (GULÇIN, 2012).

2.2 Depressão

A depressão é um distúrbio de humor crônico, recorrente e com risco de vida, que afeta 20% da população mundial (BERTON; NESTLER, 2006). É considerada como a segunda principal causa de doenças ao redor do mundo e estima-se que a prevalência desta doença irá aumentar nos próximos 10 anos (WHO, 2006).

Os sintomas da depressão incluem sentimentos intensos de tristeza, desespero, assim como inabilidade de ter prazer em atividades usuais, mudanças nos padrões de sono, perda de apetite, de energia e pensamentos suicidas (GAUDIANO et al., 2008).

Apesar dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da depressão não estarem totalmente elucidados, o estresse oxidativo, através da produção de radicais livres pode ter um papel importante na patofisiologia da depressão (EREN et al., 2007). É provável que o estresse oxidativo esteja primária ou secundariamente envolvido na patogênese da depressão.

Alguns autores demonstraram a coexistência do aumento do estresse oxidativo e sintomas de depressão em alguns pacientes, evidenciado pela deficiência de defesas antioxidantes no plasma, como superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase. Também foi observado o aumento da

peroxidação lipídica, evidenciado pela elevação na concentração de malondialdeídos (MDA) e hidroperóxidos lipídicos, quando comparados aos indivíduos saudáveis (MAES et al., 2000, SARANDOL et al., 2007, TRABER et al., 2008, TSUBOI et al., 2006). O tratamento com antidepressivos, por sua vez normaliza os níveis de marcadores do estresse oxidativo (HERKEN et al., 2007).

O cérebro é particularmente vulnerável aos danos oxidativos, visto que possui um alto consumo de oxigênio, baixos níveis de defesas antioxidantes, uma constituição rica em lipídeos, que são substratos para as reações de oxidação (peroxidação lipídica), metais como o ferro e o cobre, que atuam como catalisadores redox e neurotransmissor com potencial redutor (HALLIWELL, 2006b, VALKO et al., 2007).

No cérebro, os radicais livres, podem reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, levando à neurodegeneração (VALKO et al., 2007). A vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo e a associação entre as mudanças neurodegenerativas e doenças psiquiátricas sugerem que o estresse oxidativo possa estar envolvido na patogênese da depressão e que a suplementação com antioxidantes pode ser um novo alvo para estes tratamentos (BERK et al., 2008).

Além disso, estudos pré-clínicos sugerem que antioxidantes, na forma de sequestrantes de radicais livres, apresentam atividade antidepressiva (EREN et al., 2007, ZAFIR et al., 2009) e dessa maneira, é razoável propor que antioxidantes exógenos podem ser eficientes no tratamento da depressão. Sendo assim, compostos com potencial antioxidante podem ser alvos atraentes para o tratamento da depressão.

Na medicina moderna um grande número de fármacos antidepressivos está disponível para o tratamento da depressão. Estes atuam através de diferentes mecanismos, que incluem influência no sistema serotoninérgico, noradrenérgico e/ou dopaminérgico. Os antidepressivos aumentam os níveis de norepinefrina e serotonina algumas horas após a administração, porém o efeito terapêutico ocorre apenas após 3 – 4 semanas (HARDMAN et al., 2004).

Apesar de a depressão ser tratada farmacologicamente por três décadas, apenas recentemente a compreensão sobre os mecanismos de ação dos antidepressivos tem registrado os maiores avanços.

A teoria monoaminérgica postula que a depressão é causada por uma deficiência na transmissão de monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) no sistema nervoso central, ou ainda por uma deficiência de receptores para estes neurotransmissores (SCHILDKRAUT, 1965). As evidências que suportam essa teoria é que diversos fármacos utilizados no tratamento da depressão agem aumentando a concentração de monoaminas na fenda sináptica (ANDERSON, 2000). No entanto, esta hipótese não explica a falta de correlação temporal entre os eventos bioquímicos rápidos que aumentam as monoaminas na fenda sináptica e o início tardio dos efeitos clínicos do tratamento com antidepressivos.

Além do sistema monoaminérgico, outros sistemas parecem estar envolvidos na fisiopatologia da depressão, como o sistema glutamatérgico e a via da L-arginina óxido nítrico (PETRIE et al., 2000), o sistema opióide (GABILONDO et al., 1999), o sistema GABAérgico (NAKAGAWA et al., 1996), os canais de potássio (K^+) e os canais de cálcio (Ca^{+2}) (GALEOTTI et al., 2006). Além disso, a depressão pode ser desencadeada por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (cálcio calmodulina cinase II) (CaMKII), proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (PERERA et al., 2007, PITTENGER; DUMAN, 2008), aumento do estresse oxidativo (EREN et al., 2007) e liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imune (DUNN et al., 2005).

Foi observado que a heterogeneidade das respostas clínicas dos antidepressivos e a eficácia limitada são atribuídas aos efeitos colaterais como sedação, distúrbios no sono e disfunções sexuais (SEOL et al., 2010).

Estima-se que aproximadamente 30% dos pacientes não respondem à terapia com fármacos, por isso é extremamente necessário a pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos com potencial antidepressivo (KULKARNI, DHIR, 2009, MONTGOMERY, 2006).

Na busca por novas moléculas com potencial para o tratamento de doenças neurológicas, as pesquisas com plantas medicinais vêm progredindo constantemente em todo o mundo, demonstrando a eficácia farmacológica de diferentes espécies de plantas em vários modelos animais (ZHANG, 2004). Um exemplo é a erva de São João (*Hypericum perforatum*), utilizada no tratamento de depressões leves a moderadas (LINDE; KNUPPEL, 2005). Seu efeito antidepressivo é supostamente devido à inibição da captação de serotonina (GOBBI et al., 1999). Além disso, existem relatos sobre o aumento dos níveis de dopamina extracelular no córtex pré-frontal de ratos (YOSHITAKE et al., 2004).

Muitos estudos evidenciam o potencial das substâncias antidepressivas naturais, entre essas os OEs de *Salvia sclarea* (SEOL et al., 2010), de camomila (*Matricaria recutita* L.) (CAN et al., 2012), de *Croton Zehntneri* (LAZARINI et al., 2000) e *Valeriana wallichii* Patchouli (SAH et al., 2011) apresentaram efeitos antidepressivos.

2.3 Dor e Nocicepção

A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; MELZACK, 1999).

A dor é uma experiência sensorial de caráter subjetivo. Apesar de ser uma sensação desagradável, ela tem um importante papel biológico de denunciar quando algo não vai bem, portanto, serve como sinal de alerta para a preservação da vida (MILLAN et al., 1999).

A nocicepção, por outro lado, compreende a transmissão e o processamento da informação dolorosa. Assim, a estimulação nociva detectada pelos receptores periféricos é codificada como uma mensagem nociceptiva, a qual é progressivamente transmitida e processada em centros nervosos superiores (MILLAN et al., 1999).

Entretanto, a subjetividade da sensação dolorosa está vinculada com o aspecto comportamental. Isso acontece porque a informação nociceptiva atinge

não apenas regiões do sistema somatossensorial, mas também o sistema límbico (BYERS; BONICA, 2001, MILLAN, 1999).

Os receptores envolvidos na detecção do estímulo doloroso são chamados de nociceptores, esses receptores são terminações nervosas livres de alto limiar, que podem ser ativadas por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos. Em termos de duração, uma sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica.

Na dor transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual e, neste caso, desempenha função protetora do organismo contra possíveis danos teciduais. Em contrapartida, a dor aguda é uma resposta normal causada por uma lesão de tecido, com consequente ativação dos nociceptores no local da lesão, sendo que a dor desaparece até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado. Este tipo de dor geralmente aparece após cirurgias ou situações traumáticas e persiste por menos de um mês, possuindo também caráter protetor. Por fim, a dor crônica é causada por uma lesão tecidual ou doença que geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, este tipo de dor não desaparece mesmo quando o trauma inicial (lesão) foi resolvido, podendo durar meses ou anos, sendo um importante fator de incapacidade e sofrimento (LOTSCH; GEISLINGER, 2001, LOESER; MELZACK, 1999).

Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (STEIN et al., 2003).

Quanto a sua origem, a dor pode ser classificada em quatro tipos, de acordo com a Figura 8.

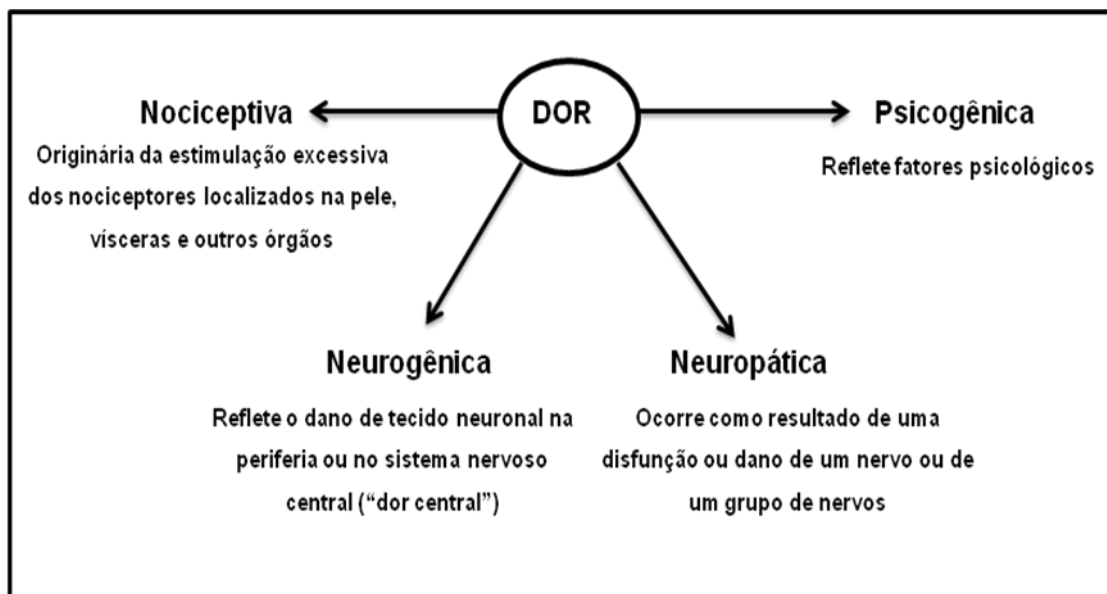


Figura 8: Classificação da dor quanto à origem (Millan, 1999)

Existe um sistema específico de dor, o qual transfere informações sobre a lesão tecidual para o local de percepção: o cérebro. A energia nociceptiva é traduzida por sinais eletrofisiológicos que são transmitidos por aparatos perceptivos. Esta plasticidade é mediada por diversos mecanismos, incluindo sensibilização periférica/primária e central/secundária. É formada por um conjunto de mediadores químicos que atuam periféricamente e na espinha, comparáveis à complexidade dos neurotransmissores no cérebro (FARQUHAR-SMITH, 2007).

A ação direta ou indireta de mediadores químicos, tais como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, serotonina, dopamina e óxido nítrico), peptídeos (cininas, taquicinas, CGRP, galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), proteínas (citocinas, fator de crescimento do nervo), entre outros, são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000).

O estímulo doloroso é propagado através das fibras aferentes primárias C ou A δ , onde se encontram os nociceptores, os quais são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas. Dentre estes, se

destacam a acetilcolina, a histamina, bradicinina, o leucotrieno, a substância P, os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, as interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF) (KRAYCHETE et al., 2006; MA; QUIRION, 2008).

As terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. As fibras A δ são mielinizadas, em função da presença da bainha de mielina e transmitem o estímulo doloroso de forma rápida. As fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades; elas são responsáveis pela transmissão lenta da dor (LEE et al., 2005). Ambas são classificadas em subtipos A δ 1, A δ 2, C1 e C2 (ROCHA et al., 2007).

Os impulsos dolorosos saem dos nociceptores localizados em diversas estruturas, como a pele, os músculos, as articulações, as vísceras, e se deslocam pelos axônios dos neurônios sensitivos primários, cujos corpos celulares formam os gânglios da raiz dorsal, terminando no corno posterior da medula espinhal e transmitindo a informação a neurônios secundários, terciários, até o córtex somestésico (LEE et al., 2005).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) interferem no processamento da informação nociceptiva. A prevalência da dor neuropática e de outras formas de dor crônica é maior em indivíduos idosos, o que sugere que os processos fisiológicos de envelhecimento aumentam a sensibilidade dos neurônios sensoriais aos estímulos nocivos (GAGLIESE; MELZACK, 1997). Além disso, a produção de radicais livres aumenta a senescência celular. A partir dessa relação, se iniciaram as especulações sobre o papel do estresse oxidativo na modulação da atividade das vias nociceptivas (CRISP et al., 2006 KHALIL et al., 1999, NOVAK et al., 1999,).

A lesão nervosa periférica ocasiona a produção de mediadores inflamatórios locais, os quais contribuem com os sinais característicos deste tipo de trauma. A resposta inflamatória periférica é intensificada pelo aumento na produção de radicais livres no local da lesão e este parece ser um dos mecanismos responsáveis pela intensificação da estimulação nociceptiva

(KHALIL et al., 1999, KAHLIL; KHODR, 2001). Assim, após a lesão nervosa periférica, os oxidantes podem promover hiperalgesia por exacerbar o dano tecidual no local da lesão. O tratamento com antioxidantes diminuiu a resposta hiperalgésica (CRISP et al., 2006, KIM et al., 2006, NAIK et al., 2006, WAGNER et al., 1998).

Muitos estudos apresentam a correlação entre os radicais livres e as respostas comportamentais encontradas após a lesão nervosa (WAGNER et al., 1998, NAIK, 2006). Em modelos experimentais de dor, tanto por lesões neuropáticas, como pela injeção de agentes pró-nociceptivos, também foi demonstrado um aumento na produção de EROs nas regiões do sistema nervoso central relacionadas à transmissão da informação nociceptiva, bem como a reversão de sinais nociceptivos com o tratamento de antioxidantes (LEE et al., 2007).

Os fármacos mais utilizados para o alívio da dor e tratamentos de inflamações são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os opióides, apesar dos efeitos colaterais (SHU, 1998; STEINMEYER, 2005; WALLACE, 2008). Logo, novos compostos com potencial anti-inflamatório e analgésico, seguros e eficientes, são necessários.

Historicamente, o homem tem utilizado diversas formas de terapias para o alívio da dor, entre estas as plantas medicinais vem se destacando devido ao seu uso popular. Um exemplo é a planta *Papaver somniferum*, conhecida popularmente como papoula-dormideira, da qual a morfina foi extraída, considerada como um protótipo de fármacos opióides analgésicos. Os fármacos opióides geralmente agem no sistema nervoso central, exercendo seus efeitos através de interações com os receptores opióides (μ , δ , κ). Estes fármacos são de grande importância para o alívio da dor crônica (ALMEIDA et al., 2001).

Na linha de utilização de produtos de origem natural, os óleos essenciais vêm sendo largamente estudados em relação ao seu potencial antinociceptivo, devido aos mínimos efeitos colaterais apresentados e também à gama de compostos presentes (LIMA et al., 2012, PINHO et al., 2012, HAJASHEMI et al., 2012,)

2.4 Óleos essenciais

A *International Standard Organization* (ISO) define os óleos essenciais (OEs) como produtos obtidos de partes de plantas através da destilação por arraste a vapor, e também como os produtos obtidos pela expressão de pericarpos de frutos cítricos. Os OEs, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são uma mistura complexa de compostos naturais e voláteis formados durante o metabolismo secundário de plantas, caracterizados por um odor forte (BAKKALI, 2008), que podem ser obtidos de diferentes partes das plantas com flores, folhas, sementes, raízes e frutos (BURT et al., 2004).

Na natureza, os óleos essenciais possuem um papel importante de proteção das plantas, atuando como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas (BAKKALI et al., 2008). A concentração de óleo essencial pode variar entre as plantas, porém em geral, não excede 1%, com exceção do óleo essencial do cravo (*Syzygium aromaticum*) e noz-moscada (*Myristica fragrans*) que possuem aproximadamente 10% de óleo essencial em massa.

Em geral, os OEs são uma mistura de aproximadamente 20–60 componentes, caracterizados por dois ou três compostos majoritários, em concentrações que podem variar entre 20–70 %, quando comparados com os outros compostos presentes (BAKKALI et al., 2008).

Os componentes presentes nos OEs incluem dois grupos principais de origem biossintética diferente (BETTS, 2001, CROTEAU et al., 2000). O principal grupo é composto por terpenos e terpenóides e o outro por constituintes alifáticos e aromáticos de baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos formam classes estruturalmente diferentes, estes são formados a partir da molécula de cinco carbonos denominada de isopreno. As principais classes de terpenos são: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e os terpenóides (terpenos oxigenados) (Figura 9).

Os compostos aromáticos e alifáticos (Figura 9) ocorrem com menor frequência, quando comparados aos terpenos. Estes são derivados do fenilpropano e incluem os aldeídos, alcoóis, fenóis, derivados metoxilados e derivados dioxi-metilenos.

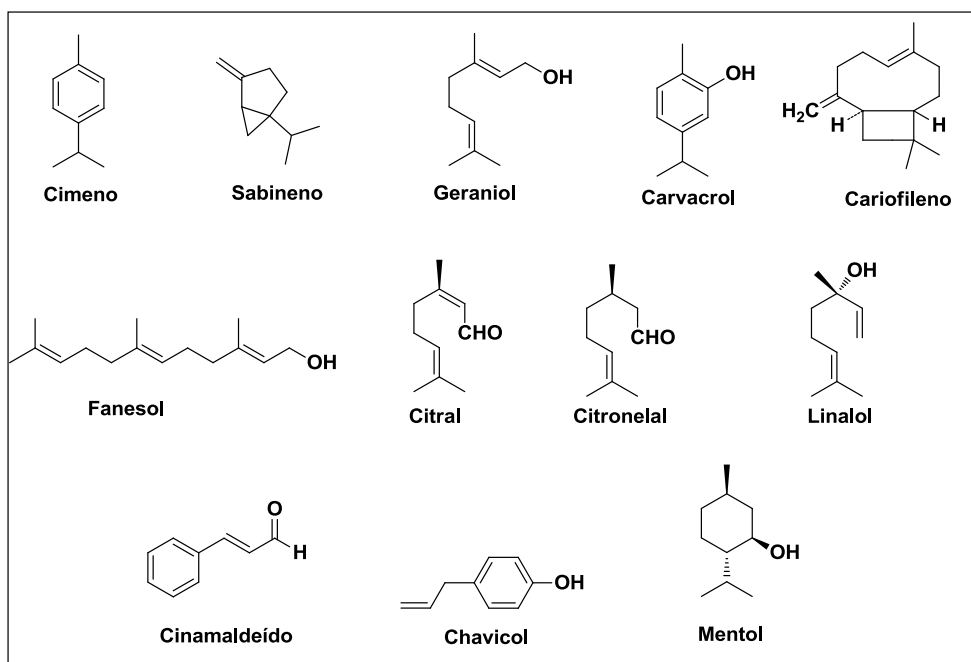


Figura 9: Estruturas químicas de alguns compostos presentes em óleos essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais e as suas concentrações podem variar dentro da mesma espécie, e óleos essenciais obtidos de diferentes plantas da mesma espécie podem apresentar composição química diferente. A concentração destes metabólitos pode variar em função de diferentes quimiotipos, origem, sazonalidade e uso de diferentes métodos de extração (BURT et al., 2004).

Os óleos essenciais são considerados como os principais componentes bioquímicos de ação terapêutica das plantas medicinais e aromáticas, constituindo matéria-prima de grande importância para as indústrias farmacêutica (compostos vegetais empregados *in natura* para a preparação de infusões e para aromatização de produtos farmacêuticos destinados a uso oral), alimentícia (condimentos e aromatizantes de bebidas e alimentos) e cosmética (perfumes e produtos de higiene) (HAJASHEMI et al., 2012).

Na indústria farmacêutica os óleos essenciais são utilizados como medicamentos ou coadjuvantes. No Brasil, um exemplo bem sucedido de fármaco obtido a partir de óleos essenciais é o Acheflan®, obtido do óleo essencial de *Cordia verbenaceae*, planta da família *Boraginaceae*, utilizado como um anti-inflamatório de uso tópico (AMORIM et al., 2009). A atividade anti-inflamatória da *C. verbenaceae* foi recentemente associada à presença de

dois sesquiterpenos encontrados no óleo essencial, α -humuleno e (-)-*trans*-cariofileno (FERNANDES et al., 2007). Como coadjuvantes os óleos essenciais são utilizados para promover a absorção de medicamentos, aumentando a absorção na epiderme devido às suas características lipofílicas (CAL, 2006).

Apesar dos óleos essenciais serem utilizados por séculos na medicina tradicional, existe uma base científica muito limitada em relação a sua utilização. O potencial biológico dos óleos essenciais e o seu potencial para o desenvolvimento de novas drogas tem sido pouco explorado (ABUHAMDAH; CHAZOT, 2008).

Os óleos essenciais tem sido estudados devido a suas múltiplas funções, como antioxidante (MIGUEL et al., 2004, SINGH et al., 2009, TEPE et al., 2007), antibacteriano (ELAISSI et al., 2011, BONATIROU et al., 2007, VARONA et al., 2013), antifúngico (TAVARES et al., 2008, TIAN et al., 2011), antiviral (ALLAHVERDIYEV et al., 2004, ASTANI et al., 2009, SCHNITZLER et al., 2008), anticâncer (GALI-MUHTASIB, 2006, SYLVESTRE et al., 2006), antidepressivo (SAH et al., 2011, ZENI et al., 2011) e antinociceptivo (AMORIM et al., 2009, HAJASHEMI et al., 2012).

A citotoxicidade dos óleos essenciais também tem sido alvo de muitos trabalhos, porém, devido à variedade de constituintes presentes, os óleos essenciais parecem não possuir alvos celulares específicos (CARSON et al., 2002). Devido à característica lipofílica estes podem atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática, rompendo as estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (BAKKALI et al., 2008). Em bactérias, a permeabilização das membranas celulares é associada às perdas de íons, redução do potencial de membrana, colapso da bomba de prótons e diminuição dos níveis de ATP (DI PASQUA et al., 2006, KNOBLOSCH et al., 1989, TURINA et al., 2006). Além disso, os óleos essenciais podem coagular o citoplasma (GUSTAFSSON et al., 1998) e causar danos à lipídeos e proteínas (BURT, 2004, ULTEE et al., 2002).

Em células eucarióticas, os óleos essenciais podem promover despolarização das membranas mitocondriais através da redução do potencial de membrana, afetando os canais de cálcio (NOVGORODOV; GUDZ, 1996, RICHTER; SCHLEGEL, 1993) e outros canais iônicos e também reduzem o

gradiente de pH, afetando dessa maneira a bomba de prótons e a produção de ATP (BAKKALI et al., 2008).

2.5 *Eugenia uniflora* L.

A família *Myrtaceae* compreende um grande número de plantas, incluindo 138 gêneros e aproximadamente 3800 espécies (WILSON et al., 2001, AURICCHIO et al., 2003) e entre elas está a *Eugenia uniflora*, comumente conhecida como pitanga. Muitas espécies são utilizadas na medicina popular no tratamento de diferentes doenças como infecções, dores e inflamações, câncer, diabetes entre outras. Muitos estudos experimentais têm demonstrado o potencial biológico dos extratos, óleos essenciais ou de frações obtidas de diferentes plantas desta família, como *Psidium guava* L. (goiaba), *Syzigium jambos* (L.) Alston (jambo rosa) e *Plinia glomerata* (jaboticaba-amarela) (AVILA-PEÑA et al., 2007, OJEWOLE et al., 2006, SERAFIN et al., 2007).

O gênero *Eugenia* é um dos gêneros com maior número de espécies na família *Myrtaceae*, contando com mais de 500 espécies, 400 das quais são encontradas no Brasil (FIUZA et al., 2008). *Eugenia uniflora* L. é originária da região que compreende o Brasil central até o norte da Argentina (BEZERRA et al., 2000). Esta árvore é encontrada principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil (LIMA et al., 2005), mas sua distribuição se fez ao longo de quase todo o território nacional e está presente em muitos centros de diversidade e domesticação brasileiros, que englobam diferentes ecossistemas tropicais, subtropicais e temperados (BEZERRA et al., 2000). A pitangueira é cultivada, ainda, na América Central, nas Antilhas, na Flórida, na Califórnia, no Havaí, na China meridional, no Sri Lanka, na Argélia, na Tunísia e no sul da França (GOMES, 2007).

A pitangueira é uma árvore semidecídua de quatro a dez metros de altura, com copa estreita e tronco liso de cor pardo clara. As folhas são simples, com três a sete centímetros de comprimento e com aroma característico. As flores brancas são solitárias ou encontradas em grupos de duas ou três nas axilas e extremidades dos ramos (GOMES, 2007).

A pitanga possui sabor doce e ácido agradáveis, com aroma peculiar intenso. O fruto é uma baga de aproximadamente 30 mm de diâmetro, achatada nas extremidades e com oito a dez sulcos longitudinais (GOMES, 2007). Com a maturação, o epicarpo evolui de verde a vermelho ou quase negro (BEZERRA et al., 2000). Esta característica originou seu nome, que significa vermelho-rubro em tupi (LOPES, 2005).

A pitanga foi introduzida na medicina empírica pelos índios guaranis no século XV (FIUZA et al., 2008). Popularmente, a infusão preparada com as folhas é utilizada como anti-hipertensivo, diurético (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002), adstringente, antipirético e para redução dos níveis de colesterol e ácido úrico (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

Existem evidências que o extrato etanólico de folhas secas, por ação dos flavonóides presentes, possui atividade inibitória da enzima xantina-oxidase, envolvida na conversão de xantina a ácido úrico (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; THEODULOZ et al., 1988). Além disso esse extrato também promove a diminuição da hiperglicemia e hipertrigliceridemia em animais por inibição da degradação de carboidratos e gorduras e da absorção intestinal de glicose (ARAI et al., 1999).

O extrato etanólico das folhas secas apresentou, ainda, atividade antifúngica contra dermatófitos (SOUZA et al., 2002), e ação antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HOLETZ et al., 2002). Além disso, o extrato etanólico possui efeito anti-*Trypanosoma*, sendo assim uma alternativa importante para o combate de doenças infecciosas, como a doença de Chagas, não apresentando toxicidade em células de mamíferos (SANTOS et al., 2012). Foi observado ainda, atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga-resistentes (MRSA) (COUTINHO et al., 2012).

O extrato obtido de folhas frescas de pitanga por sua vez, também apresentou efeito anti-inflamatório no edema induzido por carragenina em ratos (SCHAPOVAL et al., 1994). A secagem das folhas reduziu o potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de pitanga frente à peroxidação lipídica induzida em ratos (KADE et al., 2008).

Já o extrato aquoso das folhas secas, mostrou fraca ação diurética, possivelmente relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo renal, com diminuição da pressão sanguínea por vasodilatação direta (CONSOLINI et al., 1999).

Os extratos das frutas de pitanga apresentaram efeitos antioxidantes e os extratos obtidos da variedade de pitanga roxa apresentaram um melhor efeito antioxidante como sequestrante de radicais livres DPPH e redutor de íon férrico, quando comparado a outras variedades, provavelmente devido ao alto conteúdo fenólico e de antocianinas (BAGETTI et al., 2011).

O óleo essencial das folhas de pitanga possui atividade antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis*, o principal causador de micoses sistêmicas na América Latina (COSTA et al., 2010) e contra *Candida albicans*, *Cryptococcus grubii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans* (LAGO et al., 2011). O OE também apresenta atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e ação citotóxica contra linhagens de células tumorais humana PC-3 e Hep G2 e inibe completamente o crescimento de células Hs 578T (OGUNWANDE et al., 2005).

O óleo essencial possui atividade antinociceptiva central e periférica em dor induzida por modelos químico (ácido acético) e térmico (placa quente) em camundongos, além de propriedades hipotérmicas (AMORIM et al., 2009).

A composição química do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* de diferentes regiões foi bastante estudada (COSTA et al., 2010, HENRIQUES et al., 1996, MELO et al., 2007, WEYERSTAHL et al., 1988, OGUNWANDE et al., 2005) e estes estudos demonstram que ela é bastante complexa e variada.

Em grande parte dos estudos sobre a composição química do óleo essencial das folhas de *E. uniflora*, os compostos majoritários encontrados foram: selina-1,3,7-trie-8-ona, óxido de selina-1,3,7-trie-8-ona, germacrona, furanodieno e curzereno (WEYERSTAHL et al., 1988) (Figura 10). No entanto, quando são comparados os óleos essenciais de diferentes origens existe grande variabilidade na sua composição. De modo geral, apesar das variações nas concentrações dos metabólitos, o óleo essencial das folhas de *E. uniflora* possui sesquiterpenos como compostos majoritários, com exceção dos óleos

obtidos a partir de folhas da Argentina, que apresentam monoterpenos como constituintes majoritários (LAGO et al., 2011).

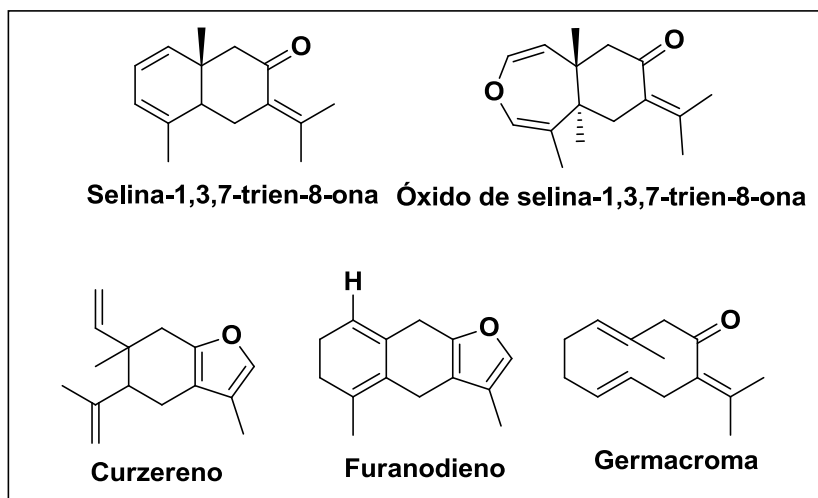


Figura 10: Principais compostos encontrados no óleo essencial das folhas de *E. uniflora*

3. JUSTIFICATIVA

Considerando: os efeitos do estresse oxidativo no organismo, através da ação das espécies reativas (ERs) em proteínas, lipídeos e no DNA; o aumento do número de casos de depressão ao redor do mundo e a necessidade de novos fármacos com alta eficiência e poucos efeitos colaterais e; a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos com potencial para o tratamento da dor; é de grande importância a busca por novas moléculas que possuam estes efeitos farmacológicos. Além destes fatores, é importante ressaltar que as propriedades antioxidante, antidepressiva e antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* L., de acordo com a literatura científica, ainda não foram descritas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial farmacológico e toxicológico do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* L.

4.2 Objetivos Específicos

Artigo #1

- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do OE das folhas de *E. uniflora* L., através da capacidade sequestrante de radicais livres sintéticos (DPPH e ABTS), de radical hidroxil e óxido nítrico, efeito tipo-superóxido dismutase (SOD), potencial redutor do íon férrico e potencial quelante do íon ferroso;
- Estudar o efeito do OE na peroxidação lipídica induzida por Ferro/EDTA no fígado, rim e cérebro de camundongos;
- Determinar o efeito pró-oxidante do OE sobre a atividade da enzima δ – aminolevulinato desidratase (δ -Ala-D) no fígado, rim e cérebro de camundongos;
- Investigar o potencial antibacteriano e antifúngico do OE;
- Determinar a dose letal *in vivo* (DL₅₀) em camundongos em um tratamento agudo (72 h) e avaliar os efeitos da administração oral do OE, utilizando como parâmetros a peroxidação lipídica, a atividade das enzimas δ -Ala D e catalase e os níveis de ácido ascórbico em fígado, rim e cérebro de camundongos;

Manuscrito #2

- Determinar o potencial hepatoprotetor e renoprotetor do OE frente a um dano induzido por paracetamol em camundongos;
- Determinar o efeito genotóxico da administração orla do OE em células de sangue periférico e medula óssea de camundongos;
- Avaliar o efeito *in vitro* do OE no ensaio DNA nicked;

Manuscrito #3

- Investigar o potencial tipo antidepressivo do OE e estudar os mecanismos envolvidos em camundongos;
- Estudar o efeito do OE na oxidação do ácido linoleico;
- Avaliar o efeito do óleo essencial na peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio em estruturas cerebrais.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma de três artigos científicos e resultados complementares.

Artigo #1: “Óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L.: propriedades antioxidantes e antimicrobianas” (Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties). Nesse artigo foi descrita a composição química, atividade antioxidante, efeito pró-oxidante, toxicidade aguda em camundongos e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L.

Manuscrito #2: “Avaliação do potencial genotóxico e hepatoprotetor do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* (Evaluation of the genotoxic and hepatoprotective effect of the of *Eugenia uniflora* L. leaf essential oil). Este se refere a avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial em células de sangue periférico e medula óssea de camundongos através do ensaio cometa e aos resultados obtidos com a administração oral do óleo essencial frente a um dano hepático e renal induzidos pela administração de uma superdosagem de acetoaminofeno (paracetamol) em camundongos. Foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: peroxidação lipídica, níveis de δ -Ala-D, catalase, tióis não proteicos (NPSH) e glutathione-S-transferase.

Manuscrito #3: “Envolvimento dos sistemas serotoninérgico e adrenérgico no efeito antidepressivo e estudo complementar da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*” (Involvement of serotoninergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect and further analysis of the antioxidant activity of *E. uniflora* L. leaves essential oil). O estudo do efeito antidepressivo em camundongos envolveu o teste de suspensão da cauda (TST); para isso, o óleo essencial foi administrado por via oral, uma hora antes do teste. Além disso, foi realizado um estudo sobre os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo, utilizando antagonistas serotoninérgicos (WAY 100635, ketanserina e ondasetron) e adrenérgicos (prazosina e yohimbina). Para estender o estudo sobre o efeito antioxidante do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* foram realizados ensaios de oxidação do ácido linoleico e TBARS em estruturas cerebrais

Os experimentos realizados neste trabalho estão esquematizados na figura 11.



5.1 Óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L.: propriedades antioxidantes e antimicrobianas

Food and Chemical Toxicology 50 (2012) 2668–2674



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

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



Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties

Francine Novack Victoria^a, Eder João Lenardão^{b,*}, Lucielli Savegnago^{c,*}, Gelson Perin^b, Raquel Guimarães Jacob^b, Diego Alves^b, Wladimir Padilha da Silva^a, Amanda de Souza da Motta^d, Patrícia da Silva Nascente^e

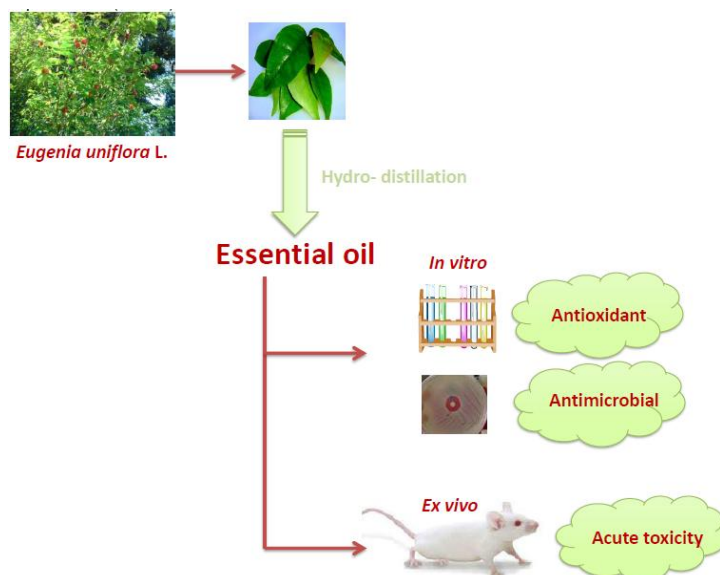
^a Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

^b Laboratório de Síntese Orgânica Limpa, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

^c Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Unidade Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

^d Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^e Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

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

Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties

Francine Novack Victoria^a, Eder João Lenardão^{b,*}, Lucielli Savegnago^{c,*}, Gelson Perin^b, Raquel Guimarães Jacob^b, Diego Alves^b, Wladimir Padilha da Silva^a, Amanda de Souza da Motta^d, Patricia da Silva Nascente^e

^a Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

^b Laboratório de Síntese Orgânica Limpa, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

^c Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Unidade Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

^d Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^e Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2011

Accepted 1 May 2012

Available online 11 May 2012

Keywords:

Eugenia uniflora

Essential oil

Antioxidant

Antimicrobial

ABSTRACT

Essential oil (EO) of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Brazilian cherry tree) was evaluated for its antioxidant, antibacterial and antifungal properties. The acute toxicity of the EO administered by oral route was also evaluated in mice. The EO exhibited antioxidant activity in the DPPH, ABTS and FRAP assays and reduced lipid peroxidation in the kidney of mice. The EO also showed antimicrobial activity against two important pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, and against two fungi of the *Candida* species, *C. lipolytica* and *C. guilliermondii*. Acute administration of the EO by the oral route did not cause lethality or toxicological effects in mice. These findings suggest that the EO of the leaves of *E. uniflora* may have the potential for use in the pharmaceutical industry.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A growing body of research in biology and medicine has been devoted to reactive oxygen species (ROS). ROS are an inevitable byproduct of cellular respiration, causing oxidation of lipids, nucleic acids, and proteins, and ROS damage is an underlying cause of disease, including cancer, inflammatory, and neurodegenerative diseases (Bakkali et al., 2008). The cells have sophisticated antioxidant regulatory systems to maintain the proper balance of ROS. However, disruption in homeostasis can result in oxidative stress and tissue injury (Halliwell et al., 1995). Thus, it is believed that exogenous antioxidant compounds could be employed to improve situations in which oxidative damage is implicated.

Natural antioxidants are in high demand for application as nutraceuticals, bio-pharmaceuticals, and food additives. In fact, in recent decades, intensive research has been performed for the extraction, characterization and utilization of natural antioxidants, which may serve as potent candidates in combating the aging process (Ozen et al., 2011). Essential oils (EOs) are volatile, natural, complex mixtures composed of secondary metabolites that are commonly concentrated in the leaves, bark or fruits of aromatic

plants (Bakkali et al., 2008). They have recently received much attention from researchers due to their multiple functions, such as their antioxidant, antimicrobial, antifungal, antiviral, antinociceptive, and anticancer activities (Bakkali et al., 2008). In the pharmaceutical industry, EOs are employed as medicines or as their coadjutants. In Brazil, examples of successful applications include the EO obtained from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), an anti-inflammatory medicine for topical use (Acheflan®) and clove oil (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), which is widely used in dental care as a sealing component and as an antiseptic for oral hygiene. As a coadjutant, the EOs are used to promote medicine absorption, increasing penetration in the epidermis due to its lipophilic characteristics (Amorim et al., 2009).

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae), known as the Brazilian cherry tree (or pitangueira), is a fruit-bearing tree widely distributed throughout Brazil and is used in popular medicine as a diuretic, anti-rheumatic, anti-febrile, and anti-inflammatory agent and as a therapeutic agent for stomach diseases (Weyerstahl et al., 1988). The Brazilian cherry tree leaves EO has been used by the Brazilian cosmetics industry for its astringent properties, which are associated with its pleasant smell. The main applications are in shampoos, hair conditioners, face and bath soaps, body oils and perfumes (Amorim et al., 2009). EOs obtained from the leaves of *E. uniflora* L. have antifungal (Costa et al., 2010), antibacterial and cytotoxic (Ogunwande et al., 2005), antinociceptive and

* Corresponding authors. Tel./fax: +55 5332757533.

E-mail addresses: lenardao@ufpel.edu.br (E.J. Lenardão), lucielli@ufpel.edu.br (L. Savegnago).

hypothermic properties (Amorim et al., 2009). However, to the best of our knowledge, no study on the antioxidant activity of EO from the leaves of *E. uniflora* L. has been reported so far. Besides, there has been remarkably little research concerning the antimicrobial activity of this EO against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Paracoccidioides brasiliensis*.

Thus, the aim of this study was to evaluate the antioxidant effects of EO from the leaves of *E. uniflora* and to analyze whether it caused acute toxicity when administered to mice. Additionally, studies were performed to evaluate the antimicrobial activity of this EO against bacteria and fungi strains. These experiments were performed to determine the usefulness of EO from the leaves of *E. uniflora* as a phytomedicine.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), ferrous chloride, sodium salicylate, ferrous sulfate, hydrogen peroxide, sodium carbonate and sodium hydroxide were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All chemicals were of analytical grade.

2.2. Animals

Adult male Swiss mice (25–35 g) were used. The mice were kept in separate animal rooms on a 12 h light/dark cycle at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and with free access to food and water. The mice were treated according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

2.3. Plant material and essential oil extraction

The leaves of the *E. uniflora* plant were collected from a research orchard (germplasm collection of Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil) in February and March of 2011 in the morning. The EO of the leaves of *E. uniflora* was extracted by hydro-distillation. The fresh leaves (600 g) were cut with scissors into small pieces and put in a 2000 ml reaction flask. After 3 h of extraction the organic phase was separated and dried over Na_2SO_4 . The distillations were performed in triplicate. The chemical composition of the crude essential oil was evaluated using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS).

2.4. Analysis of the EO

The identification and determination of the major chemical constituent ratio of the essential oil was performed by GC–MS. The oil was dissolved in hexane, and the injected sample volume was 1.0 μl . A Shimadzu GC–MS QP2010 and a Polyethylene glycol (Carbowax), model Rtx-Wax (RESTEC) (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm) capillary column were used for the analysis. The temperature was first held at 40°C , and then raised to 250°C (10 min, $20^\circ\text{C}/\text{min}$). The carrier gas was helium at a flow rate of 3 ml/min. The components of the oil were identified based on the comparison of their retention indices and mass spectra with the fragmentation patterns from computer matching with the NIST/EPA/NIH/2005 library.

2.5. Antioxidative activity

2.5.1. Assays without tissue homogenates in the test tube

The 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical-scavenging assay was performed in accordance with the procedure reported by Choi et al. (2002) with some modifications. The 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical-scavenging activity was evaluated as described by Re et al. (1999). The values are expressed as percentages of DPPH and ABTS radical inhibition compared to the control values (DMSO alone), as calculated from the following equation:

$$I(\%) = [(A_c - A_s/A_c) \times 100],$$

where I is the radical inhibition, A_c is the absorbance of the control reaction and A_s is the absorbance of the sample under analysis.

The Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) was measured according to the method described by Stratil et al. (2006) with slight modifications.

2.5.2. Assays with tissue homogenates in the test tube

2.5.2.1. Tissue preparation. The mice were euthanized by cervical dislocation, and the brain, liver and kidneys were rapidly removed, placed on ice, and homogenized in 50 mM Tris–HCl at pH 7.4 (1/10 w/v), except for the brain that was homogenized in 1/5, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 2400 rpm to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant (S_1) for each tissue, which was used for lipid peroxidation and δ -Ala-D activity assays.

2.5.2.2. Lipid peroxidation assay. Among the lipid peroxidation products used for antioxidant assays, malondialdehyde (MDA) has been most widely used to evaluate the antioxidant activity of chemicals in lipid peroxidation systems. In this work, MDA formation was used as a marker of lipid peroxidation according to the method reported by Ohkawa et al. (1979). In our study, Fe^{2+} and EDTA (at a final concentration of 1.4 mM and 500 μM) were used.

2.5.2.3. Pro-oxidant effect: δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -Ala-D) activity. δ -Ala-D is a sulfhydryl-containing enzyme and numerous metals and other compounds that oxidized sulfhydryl groups modified its activity. Cerebral, hepatic and renal δ -Ala-D activities were assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation, except that 84 mM PBS (pH 6.4) and 2.5 mM aminolevulinic acid were used.

2.6. In vivo experiments

2.6.1. Acute toxicity

To investigate the potential acute toxicity caused by the leaf essential oil of *E. uniflora* L., the mice received a single oral dose of the EO (10–200 mg/kg) or a vehicle (10 ml/kg of canola oil). After administration, the animals were observed for up to 72 h (at the interval of 24 h) to determine the lethal dose (LD_{50}) of the EO. Body weight gain was recorded as a sign of general toxicity. After 72 h of exposure, the mice were euthanized by cervical displacement, and the brains, livers and kidneys were removed, homogenized and centrifuged. The S_1 was separated and used for *ex vivo* analysis of TBARS and ascorbic acid levels as well as the δ -Ala-D and catalase activities.

2.7. Ex vivo experiments

The low-speed supernatants (S_1) of liver, kidney and brain tissue were used for the thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay according to the method reported by Ohkawa et al. (1979). The assays were performed as described in the section on *in vitro* experiments, except that the EO was not added to the reaction medium.

The δ -Ala-D activity was assayed according to the method reported by Sassa (1982) using the S_1 of liver, kidney or brain tissue, and the assays were carried out as described in the section on *in vitro* experiments, except that the EO was not added to the reaction medium.

The Catalase (CAT) activity was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H_2O_2 in the homogenate at 240 nm. The enzymatic activity was expressed in units of U CAT/mg protein.

The vitamin C determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001) with some modifications and the protein content of the S_1 was measured according to the method reported by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.8. Antimicrobial activity

2.8.1. Antibacterial activity

The following bacterial strains were used in all the antimicrobial assays: *Listeria monocytogenes* 138 ATCC 19117, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 and *S. aureus* 139 ATCC 27664. All strains were obtained from the American Type Culture Collection 140 (Rockville, MD, USA) and were maintained in soft Tryptic Soy Agar (TSA) at 4°C .

The screening of the antibacterial activity of EO was made by the agar diffusion method according to the National Committee of Clinical Laboratory Standards protocol (NCCLS, 2003). Discs of sulfazotrin and cephalotin were used as positive controls.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the EO was determined using the broth microdilution method, according to the method of NCCLS (2003), with a slight modification.

2.8.2. Antifungal activity

The tested fungal, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida globosa*, *Candida lipolytica*, *Cryptococcus laurentii* and *Trichosporon asahii*, were obtained from the Department of Microbiology at the Federal University of Pelotas. Fungal strains were maintained on Potato Dextrose (PD) agar. Fungal cultures were subcultured (1% inoculum) in PD broth at 35°C for at least 2–4 days before being used in the screening assays.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of EO was determined according to the method of NCCLS (2002). The EO was tested in concentrations ranging from 500 to 0.85 µg/ml, and the assays were repeated in their entirety to confirm the results. The MIC was recorded as the lowest concentration of the EO that inhibited the fungal growth.

2.9. Statistical analysis

Experimental results were given as the mean ± standard deviation (SD) to show variations among groups. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test when appropriate. All *in vitro* tests were performed at least three times in duplicate. For the *in vivo* assays, six to eight animals were used per group. The IC₅₀ values (concentration of sample required to scavenge 50% of the free radicals) were calculated from the graph of the scavenging effect percentage versus the compound concentration. Differences were considered statistically significant at a probability of less than 5% ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition of the EO

The essential oil of Brazilian cherry tree leaves was analyzed by GC/MS. The mass fragmentation pattern of the chemical constituents, their molecular range and linear retention indices (LRI) permitted the identification of the major constituents of the EO.

The *E. uniflora* L. EO has oxygenated and non-oxygenated sesquiterpenes as the major constituents, with a prevalence of the non-oxygenated species (Fig. 1). The major components identified were germacrene **5** and selina-1,3,7-(11)-trien-8-one oxide **3**. These findings are in partial agreement with other works describing the chemical composition of the essential oil from *E. uniflora* (Weyerstahl et al., 1988; Amorim et al., 2009; Costa et al., 2010; Oliveira et al., 2006).

Despite a slight variation in their chemical compositions, the predominance of sesquiterpenes in *E. uniflora* EOs was confirmed, except in an Argentine specimen, rich in monoterpenes (Lago et al.,

2011; Amorim et al., 2009; Weyerstahl et al., 1988; Urbiergo et al., 1987). Concentration changes of these metabolites seem to be due to chemotypes, geographical origin, and seasonality and to the use of different oil extraction methods (Burt, 2004). There is a considerable variety in the concentration of these constituents when comparing essential oils from different origins and even a lack of these compounds. For instance, in a recent study, performed by Lago et al. (2011), selina-1,3,7-(11)-trien-8-one **4** was not detected in the leaves EO of *E. uniflora*, in contrast with observed by us and others (Weyerstahl et al., 1988; Amorim et al., 2009; Costa et al., 2010).

3.2. In vitro results

3.2.1. Antioxidative activity

There are many different methods for determining antioxidant function, each of which depends on a particular generator of free radicals, acting by different mechanisms (Huang et al., 2005).

In this study, the EO of *E. uniflora* L. showed DPPH scavenging activity, as observed in Fig. 2a, and the IC₅₀ value was 833.3 ± 20.7 µg/ml. This IC₅₀ value is comparable with other findings described in the literature for terpenoid-rich EOs, such as *Lycopus lucidus* Turcz and *Thymus algeriensis*, which showed scavenging activity against the DPPH radical with IC₅₀ values of 950 and 800 µg/ml, respectively (Yu et al., 2011; Zouari et al., 2011).

Regarding the major compounds of the leaf EO of *E. uniflora* L., there has been remarkably little research about its bioactivity. A literature survey revealed that germacrene **D** **7** is a strong antioxidant due to its extra cyclic methylene moiety and that β-caryophyllene **2** possesses free-radical scavenging activity as determined by the DPPH assay (Damien et al., 2010). However, the antioxidant effect of essential oils cannot be attributed to their major constituents because minor compounds are likely to play a

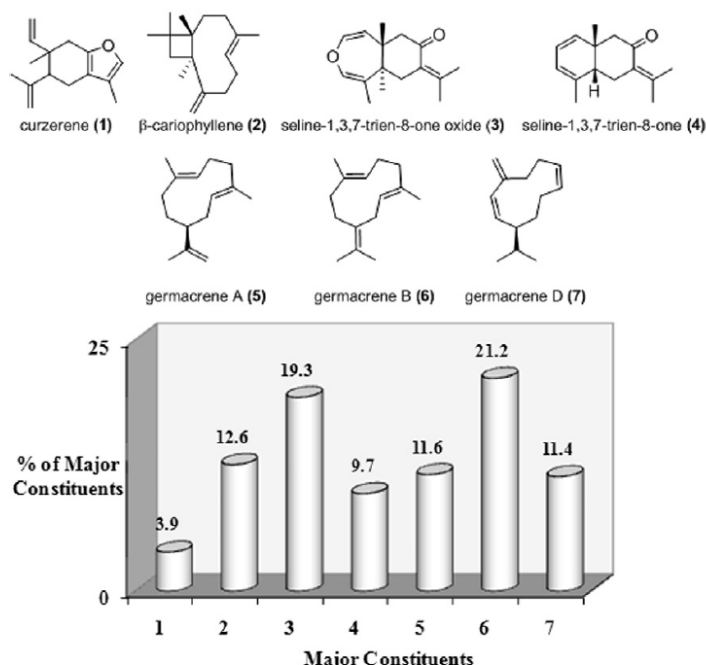


Fig. 1. Chemical composition of the *Eugenia uniflora* L. essential oil.

significant role in the observed activity, and synergistic effects have also been reported (Peschel et al., 2006).

The ABTS coloring method is another commonly used assay to evaluate the antioxidant activity of different substrates *in vitro*. Reduction of ABTS^{•+} radical cations can be even more efficient than that of DPPH[•] (Barreca et al., 2011). The ABTS radical scavenging activity of *E. uniflora* L. leaf EO is depicted in Fig. 2b, and this result demonstrated that the EO has a good ability to scavenge ABTS radicals, displaying an IC₅₀ value of 8.1 ± 0.20 µg/ml.

Comparing the IC₅₀ values of the ABTS (8.1 µg/ml) with those of DPPH (833 µg/ml) assays, it is possible to propose that the *E. uniflora* L. essential oil was more potent in the ABTS assay, suggesting that the mechanism of its antioxidant activity is principally based on single electron transfer.

Many reports have demonstrated that the reducing power of natural plant extracts and essential oils might be strongly correlated with their antioxidant activities (Stratil et al., 2006). Thus, based on this evidence, the FRAP assay was also used to determine the reducing power of the EO of the leaves of *E. uniflora* L. to elucidate the relationship between its antioxidant effect and its reducing power. As shown in Fig. 2c, the EO exhibited ferric-reducing ability, and the reducing power was improved by increasing its concentration. This result is in agreement with the findings from the ABTS assay and confirms that the antioxidant power of the EO can be due to electron transfer.

The correlation coefficient was also established among the different antioxidant activity assays by a linear regression analysis. Among the methods used for quantifying the antioxidant activity, the correlations between ABTS, DPPH and FRAP are shown in Table 1. The correlation coefficients of the DPPH radical scavenging capacity and both the FRAP and ABTS assays taken together were 0.96 ($p < 0.001$) and 0.94 ($p < 0.001$), respectively. The FRAP and ABTS assays also showed significant correlations ($R^2 = 0.80$). In addition, the significant correlation ($R \geq 0.80$) between the IC₅₀

Table 1

Linear correlation coefficients, R^2 , for the relationship between the DPPH, ABTS and FRAP assays for the leaf EO of *Eugenia uniflora* L.

	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)
ABTS (IC ₅₀)	0.94***	–
FRAP (at 100 µg/ml)	0.96***	0.80***

Asterisk represents significant effect ($p < 0.001$).

values (DPPH and ABTS) and the values of the reducing power suggested that the components present in the EO that are capable of scavenging DPPH and ABTS radicals are also able to reduce ferric ions.

Furthermore, it has been demonstrated that the three different assays employed (DPPH, ABTS and FRAP), even though they are all ET-based (electron transfer) rather than HAT-based (hydrogen atom transfer) antioxidant tests, may yield different results, owing to their individual mechanisms and kinetics of radical inactivation and to the different pH values at which they are carried out (Huang et al., 2005).

Excessive production of free radicals can generate a lipid peroxidation chain reaction and lipid peroxidation, which are responsible for pathological disorders. In this study, we demonstrated that Fe²⁺/EDTA can induce lipid peroxidation in mice tissue homogenates *in vitro* (data not shown). However, in the present study, *E. uniflora* L. EO at all the tested concentrations did not reverse damage caused by the Fe²⁺/EDTA system on TBARS in the liver, kidney and brain (data not shown).

3.2.2. Pro-oxidant effect: δ -Ala-D activity

δ -Ala-D is a sulfhydryl-containing enzyme that is inhibited by a variety of sulfhydryl reagents (Sassa, 1982). In this study, the Brazilian cherry EO did not alter the enzyme activity in liver, kidney and brain of mice.

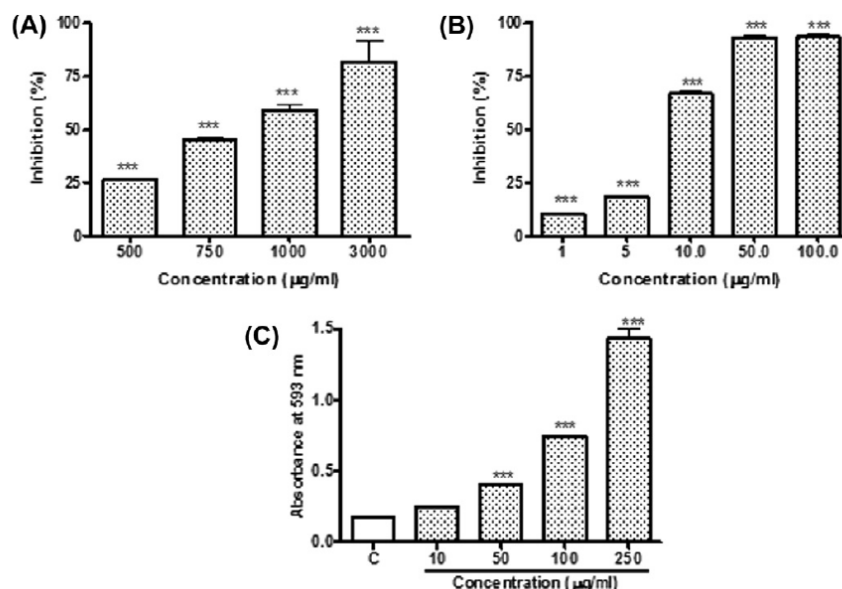


Fig. 2. Antioxidant activities of the leaf EO of *Eugenia uniflora* L.: (A) DPPH radical-scavenging activity. The values are expressed in percentage of inhibition in relation to a control without essential oil. The mean value of absorbance (517 nm) of the control is 0.73 ± 0.30 . (B) ABTS radical-scavenging activity. The values are expressed in percentage of inhibition in relation to a control without essential oil. The mean value of absorbance (734 nm) of the control is 0.58 ± 0.02 . Each value is expressed as a mean $\pm$ SD ($n = 4$). (C) Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP). The values are expressed in absorbance; the mean value of absorbance (593 nm) of the control is 0.17 ± 0.02 . Each value is expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 4$). *** $p < 0.001$ when compared with the respective control without essential oil (one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test when appropriate).

Table 2Effect of acute treatment with leaf EO of *Eugenia uniflora* L. on the δ -Ala-D and catalase activities and on the ascorbic acid levels.

Dose (mg/kg)	δ -Ala-D (nmol PBG/mg protein)			Catalase (Ucat/mg protein)			Ascorbic acid (μ g AA/g tissue)		
	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney	Brain
0 (control)	28.6 $\pm$ 9.0	1.35 $\pm$ 0.20	1.27 $\pm$ 0.50	1.33 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.01	762.2 $\pm$ 6.60	733.9 $\pm$ 4.51	766.4 $\pm$ 6.61
10	25.60 $\pm$ 8.20	1.40 $\pm$ 0.18	1.40 $\pm$ 0.56	1.63 $\pm$ 0.32	0.70 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.05	755.6 $\pm$ 3.72	731.6 $\pm$ 6.65	754.0 $\pm$ 1.29*
50	24.20 $\pm$ 6.80	1.23 $\pm$ 0.14	1.53 $\pm$ 0.46	2.10 $\pm$ 0.26	0.72 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.09	755.5 $\pm$ 5.33	733.5 $\pm$ 6.10	759.7 $\pm$ 2.53
100	27.11 $\pm$ 3.00	1.47 $\pm$ 0.28	1.31 $\pm$ 0.51	1.80 $\pm$ 0.45	0.76 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.06	755.1 $\pm$ 6.60	734.3 $\pm$ 5.60	753.5 $\pm$ 5.75**
200	15.20 $\pm$ 9.50	1.30 $\pm$ 0.31	1.24 $\pm$ 0.56	1.82 $\pm$ 0.75	0.66 $\pm$ 0.13	0.35 $\pm$ 0.13	757.7 $\pm$ 4.10	732.6 $\pm$ 5.05	759.5 $\pm$ 0.80

The values were analyzed by one-way ANOVA, each value is expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 6$). Asterisks represent significant effects ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared with the respective control.

3.3. In vivo experiments

3.3.1. Acute toxicity

A single oral administration of *E. uniflora* L. leaf EO at 10, 50, 100 and 200 mg/kg did not cause death in any animal when compared to the control group (canola oil). The LD₅₀ value obtained for the EO certainly is greater than 200 mg/kg given that lethality was not observed at that dose. The administration of EO at these doses did not cause significant reduction in the body weight when compared to the control group (data not shown).

3.4. Ex vivo experiments

3.4.1. Lipid peroxidation

The levels of TBARS after oral exposure to Brazilian cherry EO changed at doses between 10 and 200 mg/kg, demonstrating the significant ability of the EO to reduce lipid peroxidation in the kidney. However, the acute exposure of EO in mice did not have any effect on the liver and brain (Fig. 3). These data suggest that the EO does not cause any oxidative stress in mice tissue after acute treatment, thought it reduces the levels of TBARS in mice kidneys.

3.4.2. δ -Ala-D activity

The hepatic, renal and cerebral δ -Ala-D activities were not affected by treatment with *E. uniflora* L. EO. This is the first report on the toxicological parameters of this EO, and the data show that it is not toxic to the liver, brain and kidney of mice. Ogunwande et al. (2005) study the toxicity of the EO from the leaves and fruits of *E. uniflora* L. in other experimental model and the results revealed cytotoxicity towards the PC-3 and Hep G2 human tumor cell lines and complete inhibition of the growth of Hs578T.

3.4.3. Catalase activity

CAT activity was not altered in the liver, kidney or brain of mice treated with the EO at any of the tested doses when compared to the control group.

3.4.4. Vitamin C levels

Ascorbic acid is always considered a marker of oxidative stress, and a decrease in its content might indicate an increase in oxidative stress (Jacques-Silva et al., 2001). Exposure to *E. uniflora* L. EO did not alter vitamin C levels in the liver, kidney or brain.

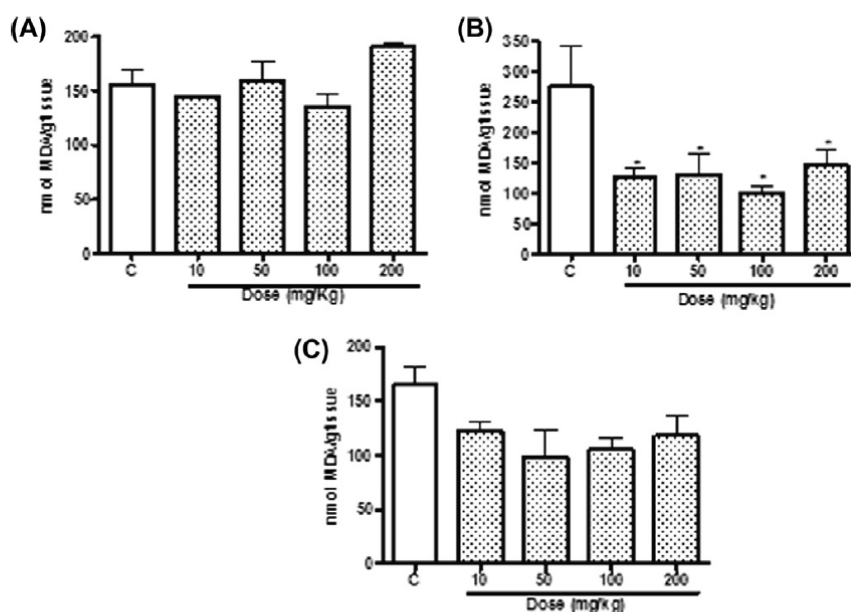


Fig. 3. Effect of the leaf EO of *Eugenia uniflora* L. on lipid peroxidation in the liver (A), kidney (B) and brain (C) of mice. Each value is expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 6$). Asterisks represent significant effects (* $p < 0.05$) compared with the respective control (C) without essential oil by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test when appropriate.

Table 3
Antibacterial activity of leaf EO of *Eugenia uniflora* L.

Bacteria	Inhibition zone (mm)		
	<i>Eugenia uniflora</i>	Sulphadiazine	Cephalotine
<i>L. monocytogenes</i>	18 ± 3.2*	30	24
<i>S. aureus</i>	26 ± 7.0***	36	40
<i>E. coli</i>	10 ± 0.6	28	32
<i>S. dysenteriae</i>	NA	30	26
<i>P. aeruginosa</i>	8 ± 0.5	22	27
<i>S. enteritidis</i>	NA	44	28
<i>A. hydrophilla</i>	13 ± 3.0	20	24

The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman–Keuls multiple comparison test, each value is expressed as the mean ± SD ($n = 3$). Asterisks represent significant effects (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) when compared with the respective diameter of the paper disk (6 mm).

NA – non active.

The concentrations of EO, sulphadiazine and cephalotine used were 4.35 mg/disk, 5 and 5 µg/disk, respectively.

Table 4
Antifungal activity of leaf EO of *Eugenia uniflora* L.

Fungi	MIC (µg/ml) ^a
<i>C. albicans</i>	208.3 ± 72.1
<i>C. globosa</i>	187.5 ± 72.1
<i>C. guilhermondii</i>	109.4 ± 31.2
<i>C. parapsilosis</i>	208.3 ± 72.1
<i>C. lipolytica</i>	93.7 ± 36.1
<i>T. asahii</i>	312.5 ± 125
<i>C. laurentii</i>	208.3 ± 72.1

Each value is expressed as mean ± SD ($n = 3$).

^a MIC = minimal inhibitory concentration.

3.5. Antimicrobial activity

In this study, we screened the antimicrobial activity of the *E. uniflora* L. leaf EO against eight bacteria in the disk diffusion assay (Table 3). For comparison, sulphadiazine and cephalotine were used as standards. The EO showed activity statistically different against two gram positive strains: *L. monocytogenes* and *S. aureus* when compared with the diameter of the disk (negative control). However, when the Gram-negative strains were subject to the EO, no activity was observed. This gram-positive-specific activity was also observed for other EOs (Lago et al., 2011; Tiwari et al., 2009; Gutierrez et al., 2008; Burt, 2004). In other study, however, the EO of *E. uniflora* L. was not gram-specific, presenting antibacterial activity against *Bacillus cereus* (gram-positive), *S. aureus* (gram-positive), *E. coli* (gram-negative) and *P. aeruginosa* (gram-negative) (Ogunwande et al., 2005).

In agreement with our results from the disk diffusion assay, the results on the minimum inhibitory concentration (MIC) determination indicated that the EO had the lower MIC values for *S. aureus* (0.8 mg/ml) and *L. monocytogenes* (1.04 mg/ml), two gram-positive bacteria. Delamare et al. (2007) studied the antibacterial activity of EO of *Salvia officinalis* cultivated in South Brazil and according to this study, the MIC against *S. aureus* was between 5.0 and 10.0 mg/ml. Thus, the EO of *E. uniflora* is more effective on the growth inhibition of *S. aureus* than the *S. officinalis* EO. Another essential oil with antibacterial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes* is the EO of Brazilian species of *Cunila*. Among the studied species, the *Cunila galioides* showed lower values of MIC: 0.62 and 1.25 mg/ml for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively (Sandri et al., 2007).

In our study about antifungal activity, EO presented MIC values ranging from 93.7 to 312.5 µg/ml (Table 4). The antifungal activity of *E. uniflora* EO was also evaluated against *C. albicans* and *C. parapsilosis* by others (Lago et al., 2011), showing MIC values of

1800 and 3750 µg/ml, respectively, while in our study MIC values of 208 µg/ml were founded for both strains (Table 4). The presence of germacrene 5–7 and seline-1,3,7-trien-8-one 4 have been reported as being responsible by the antifungal activity of *E. uniflora* EO (Costa et al., 2010).

4. Conclusion

Essential oils are, from the chemical point of view, quite complex mixtures composed of several tens of components, and this complexity often makes it difficult to explain the properties of the EO. However, essential oils are a source of natural components with promising pharmacological properties, and for this reason, research into their properties is ongoing. The essential oil of the leaves of *E. uniflora* L. showed antioxidative activity in three different assays, establishing authenticity for the results. Furthermore, the essential oil presented a LD₅₀ higher than 200 mg/kg in mice and antimicrobial activity against bacteria and fungi strains. More studies are necessary to elucidate the mechanism of action of the *E. uniflora* L. EO aiming future applications as a phytomedicine.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Grant 472644/2010-6), FINEP, CAPES and FAPERGS (PRONEX 10/0027-4 and 10/0005-1, PqG 1012043 and 11/0881-2).

References

- Aebi, H., 1984. Catalase 'in vitro'. *Methods Enzymol.* 105, 121–127.
- Amorim, A.C.L., Lima, C.K.F., Hovell, A.M.C., Miranda, A.L.P., Rezende, C.M., 2009. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomed.* 16, 923–928.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of 287 essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Barreca, D., Bellocchio, E., Caristi, C., Leuzzi, U., Gattuso, G., 2011. Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues leaves and seeds. *Food Chem.* 129, 1504–1512.
- Burt, S., 2004. Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161–1168.
- Costa, D.P., Alves Filho, E.G., Silva, L.M.A., Santos, S.C., Passos, X.S., Silva, M.R.R., Seraphim, J.C., Ferri, P., 2010. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *eugenia uniflora* leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 851–858.
- Damien, D.H.J., Christina, F.A., Jose, B.A.G., Stanley, D.G., 2010. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flav. Frag. J.* 15, 12–16.
- Delamare, L.A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Tti-Serafini, L., Echeverrigaray, S., 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 100, 603–608.
- Gutierrez, J., Rodrigues, G., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables. *Antimicrobial and sensory screening. J. Food Prot.* 71, 1846–1854.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I., 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 7–20.
- Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119–125.
- Lago, J.H.G., Souza, E.D., Mariane, B., Pascon, R., Vallin, M.A., Martins, R.C.C., Baroli, A., Carvalho, B.A., Soares, M.G., Santos, R.T., Sartorelli, P., 2011. Chemical and

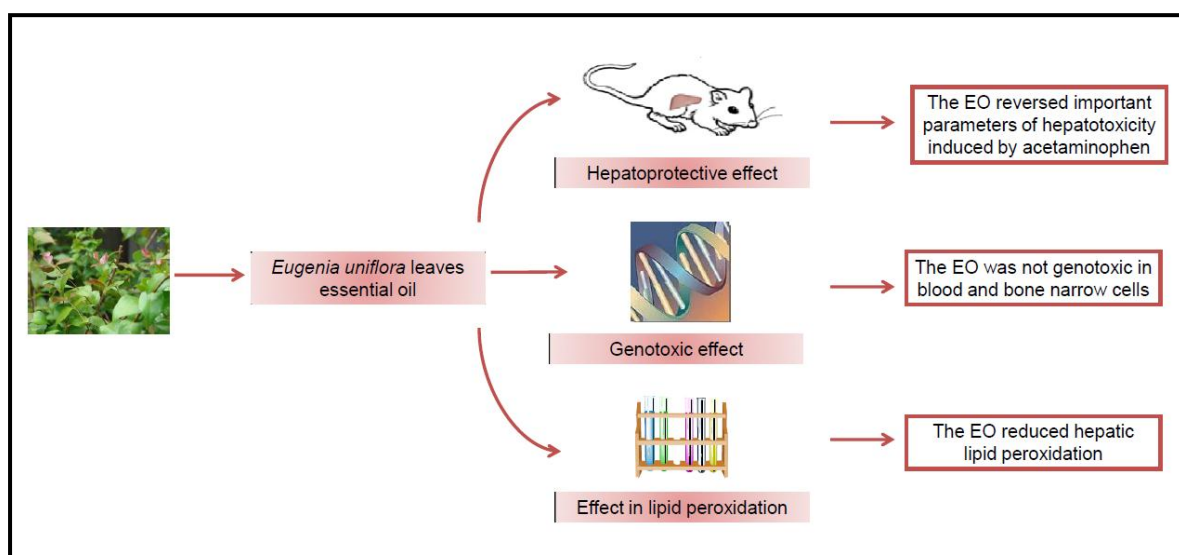
- biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae-*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kauser. *Molecules* 16, 9827–9837.
- Lowry, O.H., Roseburg, N.J., Farr, A.L., Roudall, R., 1951. Protein measurement with folin–phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards), 2003. 328 Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved Standards, third ed. M2–A8.
- NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards), 2002. In: National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. M27–A2.
- Ogunwande, I.A., Olawore, N.O., Ekundayo, O., Walker, T.M., Schmidt, J.M., Setzer, W.N., 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *Int. J. Arom.* 15, 147–152.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oliveira, A.L., Lopes, R.B., Cabral, F.A., Eberlin, M.N., 2006. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chem.* 99, 1–5.
- Ozen, T., Demirtas, I., Aksit, H., 2011. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem.* 124, 58–64.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartz, I., Jiménez, D., 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* 97, 137–150.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A.P.L., Echeverrigaray, S., 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus of *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chem.* 103, 823–828.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133–145.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 607–616.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5987–6000.
- Urbiergo, G., Taher, H.A., Talenti, E.C., 1987. Chemical composition of essential oil of *Eugenia Uniflora*. *An. Ass. Quim. Argent.* 75, 377–379.
- Weyerstahl, P., Marschall-Weyerstahl, H., Christiansen, C., Oguntimein, O., Adeoye, A.O., 1988. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Med.* 54, 546–549.
- Yu, J., Lei, J., Zhang, X., Yu, H., Tian, D., Liao, Z., Zou, G., 2011. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. Var. *hirtus* Regel. *Food Chem.* 126, 1593–1598.
- Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A., 2011. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food Bioprod. Proc.* 89, 257–265.

5.2 Avaliação do potencial genotóxico e hepatoprotetor do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*

O seguinte trabalho foi submetido para o periódico *Phytomedicine*, sendo assim está formatado de acordo com as normas da revista.

Evaluation of the genotoxic and hepatoprotective effect of the of *Eugenia uniflora* L. leaf essential oil

Francine Novack Victoria^{a,c}, Roberta Gonçalves Anversa^b, Sibeke Borsuk^b, Lucielli Savegnago^{b,*}, Eder João Lenardão^{c,*}



ABSTRACT

The goal of this work was evaluate the hepatoprotector activity of *E. uniflora* leaves EO and its potential genotoxic effect in mice. The effects of the essential oil on hepatic and renal injuries, induced by acetaminophen (AA), were evaluated by analyzing the biochemical parameters: TBARS, δ -Ala-D and catalase activities, NPSH, GST and plasmatic levels of AST and ALT. To extend our studies on the toxicological effect of the EO, its effect on comet and DNA nicked assays was evaluated. The exposure to AA increased lipid peroxidation in liver and kidney, decreased the NPSH content in liver and the δ -aminulevunilate dehydratase activity, and caused an increase on the glutathione S-transferase activity on mice's liver. AA also promotes an increase on plasma AST and ALT activities. The *E. uniflora* leaves EO (200 mg/kg) restored all of the biochemical parameters modified by the injury caused by the AA on liver of mice and also decreased the levels of MDA on kidneys. The results of comet assay demonstrated that the EO did not induce any genotoxic damage in bone marrow and peripheral blood of mice and it also did not alter the super coiled structure of plasmid on DNA nicked assay. This work shows for the first time the effect of *Eugenia uniflora* leaves EO on attenuating the injury caused by acetaminophen on mice and in the comet assay.

Key-words: essential oil, acetaminophen, oxidative stress, comet assay.

Introduction

In recent years, essential oils (EOs) and their constituents have received considerable attention due to their diverse pharmacological properties. A growing interest has been observed in the evaluation of the EOs for their health benefits, one of the main properties being its antioxidant activity, which enables them to attenuate the development of tumor, inflammation and liver disease (Bhadauria 2010). EOs can act as antioxidant agents by scavenging free radicals and increasing antioxidants defenses (Bakkali et al. 2008; Victoria et al. 2012).

The leaves of *E. uniflora* are source of functional compounds (Bagetti et al. 2009) and are used in folk medicine as antipyretic, stomachic, hypoglycemic (Aurichio & Bacchi, 2003; Matsumura et al. 2003), and anti-inflammatory (Weyerstahl et al. 1988).

The essential oil of leaves of *E. uniflora* has been studied with regards to its antinociceptive and hypothermic activity (Amorim et al. 2009), antibacterial and cytotoxic (Ogunwande et al. 2005) and antifungal action (Costa et al. 2009). In a previous report our research group described the antioxidant, and antimicrobial activity of this EO. Moreover, in that study we observed that the acute administration of the *E. uniflora* leaves EO did not cause lethality or toxicological effects in mice (Victoria et al. 2012).

Many studies have been conducted to investigate the effect of medicinal and aromatic plants on human tissues and DNA damage (Bhourri et al. 2010; Neffati et al. 2009), since many xenobiotics can damage DNA strands and cause lipid peroxidation (Neffati et al. 2009). In fact, oxidation has been pointed out as a fundamental cause of human DNA damage (Marnett 2000).

The damages caused by ROS are related with many diseases, like cancer, heart disease, stroke, diabetes (Halliwell 2006) and also to hepatic disorders (Loguercio 2003). The role of oxidative stress in hepatic disorders has been studied since this is a world health problem (Vitaglione et al. 2004).

Acetaminophen (AA) is a commonly used and effective analgesic and antipyretic agent for relieving mild and moderate pain, which is safely employed at therapeutic dose (Dargan et al. 2002). The toxicity mechanism of AA in the

liver is not fully understood, however several studies demonstrated that the metabolization of this drug is responsible by its toxic effects. In an over dosage of AA, sulfation and glucuronidation become saturated, generating a large amount of *N*-acetylbenzoquinone imine (NAPQI), which accounts for the depletion of GSH (Dahlin et al. 1984). NAPQI in excess causes oxidative stress and binds covalently to liver proteins (Jaeschke et al. 2003).

To the best of our knowledge, the effect of the *E. uniflora* leaves essential oil on the hepatic and renal injuries induced by AA, and its genotoxic potential on mice cells have not been reported. Hence, the aim of this study was to evaluate the effects of the *E. uniflora* leaves EO on the hepatic and renal damage caused by acetaminophen in mice. Furthermore, we analyze the genotoxic effect of the EO by the comet assay, and its effect on DNA damage by the DNA nicked assay.

Material and Methods

Animals

Adult male Swiss albino mice (25–35 g) were maintained in acclimatized room (20–25 °C) under natural lighting conditions with water and food *ad libitum*. The mice were treated according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Chemicals

All reagents and chemicals were of analytical grade or higher purity and obtained from standard commercial suppliers.

Plant Material and Essential Oil

The leaves of *E. uniflora* were collected from a research orchard (germplasm collection of Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil) in February and March of 2011 at the morning. The EO was extracted by hydro-distillation. The fresh leaves were cut with scissors into small pieces and put in a 2000 ml round bottomed flask. After 3 h of extraction, the organic phase was separated and dried over Na₂SO₄. The distillations were performed in triplicate.

The chemical composition of the crude essential oil was evaluated using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS).

Analytical methods

The identification and determination of the major chemical constituents ratio of the essential oil were performed by GC-MS. The oil was dissolved in hexane, and the injected sample volume was 1.0 µl. A Shimadzu GC-MS QP2010 and a polyethylene glycol (Carbowax), model Rtx-Wax (RESTEC) (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm) capillary column were used for the analysis. The temperature was first held at 40 °C, and then raised to 250 °C (10 min, 20 °C/min). The carrier gas was helium at a flow rate of 3 ml/min. The components of the oil were identified based on the comparison of their retention indices and mass spectra with the fragmentation patterns from computer matching with the NIST/EPA/NIH/2005 library.

Experimental procedure

Hepatoprotective effect against AA-induced hepatotoxicity

To investigate the possible effect of the *E. uniflora* EO in restoring the oxidative damage induced by acetaminophen (AA) in mice, the animals were randomly divided in four groups with six to eight animals each.

Mice received a single oral dosage of AA (300 mg/kg, 10 ml/kg) or vehicle (saline solution, 10 ml/kg) and after 30 min the EO (200 mg/kg) or vehicle (canola oil, 10 ml/kg) were administered. After 24 h, the mice were anesthetized with ether for heart blood puncture. Blood was collected in tubes containing heparin and plasma was obtained by centrifugation. Liver and kidneys were rapidly removed, dissected, kept on ice and homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 and then centrifuged to obtain the low-speed supernatant S₁. The plasma was used for determination of the activity of the enzymes AST and ALT and the S₁ was used for determination of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), δ-aminolevulinic acid dehydratase (δ-Ala-D), catalase and glutathione S-transferase activities and for the levels of non-proteic thiols.

Group 1: Vehicle AA (saline solution) + Vehicle EO (canola oil)

Group 2: AA (300 mg/kg) + Vehicle EO (canola oil)

Group 3: Vehicle AA (saline solution) + EO (200 mg/kg)

Group 4: AA (300 mg/kg) + EO (200 mg/kg)

The doses of the EO were chosen based on previous studies that show that these doses do not have any toxic effects by the oral route (Victoria et al. 2012).

Biochemical parameters

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay

Lipid peroxidation in liver and kidneys was performed by the formation of TBARS during acid-heating reactions as previously described by Ohkawa (1979). Malondialdehyde (MDA), which was formed as an end product of the peroxidation of lipids, served as an index of the intensity of oxidative stress. MDA reacts with thiobarbituric acid to generate a colored product that can be measured optically at 532 nm.

δ -Aminolevulinic acid dehydratase (δ -Ala-D) assay

δ -Ala-D is extremely sensitive to the presence of pro-oxidants species, which can oxidize its –SH groups during the oxidative stress. The δ -Ala-D activity was assayed using the method of Sassa (1982) by measuring the rate of porphobilinogen formation, except that 84 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.5 mM aminolevulinic acid were used.

Non-protein thiol group assay

Non-protein thiol was analyzed by the method of Ellman (1959) with modification described by Jacques-Silva (2001).

Catalase activity

CAT is an enzymatic antioxidant defense that is involved in protecting against the injurious effects of reactive oxygen species (ROS). Catalase was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the S₁ at 240 nm.

Glutathione S-transferase (GST)

GST appears to be an evolutionary response of cells for protection against chemical toxicity and oxidative stress (RAZA et al. 2011). GST activity was determined as described by Habig et al. (1974), through the conjugation of glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm.

Plasmatic AST and ALT activities

Plasma aspartate (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were quantified as biochemical endpoints of hepatotoxicity using commercial kits (LABTEST, Diagnostica S.A., Brazil) and according to the method of Reitman and Frankel (1957).

Protein Quantification

The protein content was measured according to the method of Lowry (1951) using serum bovine albumin as a standard.

*Effect of *E. uniflora* EO on basal lipid peroxidation*

To extend the studies about the antioxidant potential of the EO, its effect on the in vitro basal lipid peroxidation on liver and kidney was evaluated according to the methodology of Ohkawa et al. (1979).

Comet assay

To evaluate the genotoxic effect of the *E. uniflora* EO, mice (n = 6 animals) were treated by gavage with a single dose of canola oil (negative control, 10 ml/kg), EO (10, 100 and 500 mg/kg, p.o) and methyl methanesulfonate (positive control, 200 mg/kg, p.o) and, after 24 h, the animals were anesthetized to blood puncture and euthanized to collections of bone marrow. The alkaline version of comet assay was performed according to Singh et al. (1988) with slight modifications. The extent and distribution of DNA damage indicated by the comet assay was quantified by visual classification of cells into categories of 'comets' corresponding to the amount of DNA in the tail, according to Anderson et al. (1994) with slight modification. One hundred cells were visually categorized according to tail size into four types: (1) Type 0: no

tail; (2) Type I: with a tail shorter than the head diameter; (3) Type II: with a tail length 1-2 x the head diameter and (4) Type III: with a tail length 2-3 x the head diameter. The total score for 100 comets was obtained by multiplying the number of cells in each type by the number of the damaged type.

DNA nicked assay

The effect of *E. uniflora* leaves EO on DNA nicked was evaluated using super coiled DNA of pCDNA3 plasmid (Invitrogen), according the method of Lee et al. (2002) with modifications. A mixture of 5 µl of EO at different concentrations (10-100 µg/ml) and plasmid DNA (1 µg) was incubated for 30 min at 37 °C. The final volume of the mixture was made up to 15 µl. The DNA was analyzed on 1% agarose gel using blue-green[®] staining and photographed in a Epi Ligth apparatus (Loccus Biotechnologia).

Statiscal analysis

The results are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by the D'Agostino & Pearson omnibus normality test, using one-way and two-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls multiple range test when appropriate. Difference was considered statistically significantly at a probability of less than 5 % ($p < 0.05$).

Results

Chemical composition of the EO of E. uniflora

The essential oil of *E. uniflora* leaves was obtained in a 0.1% yield. Seven compounds, representing 90% in weight of the essential oil have been identified. As can be seen in Figure 1, the main compound of the essential oil of *E. uniflora* is germacrene B, followed by seline-1,3,7-trien-8-one oxide.

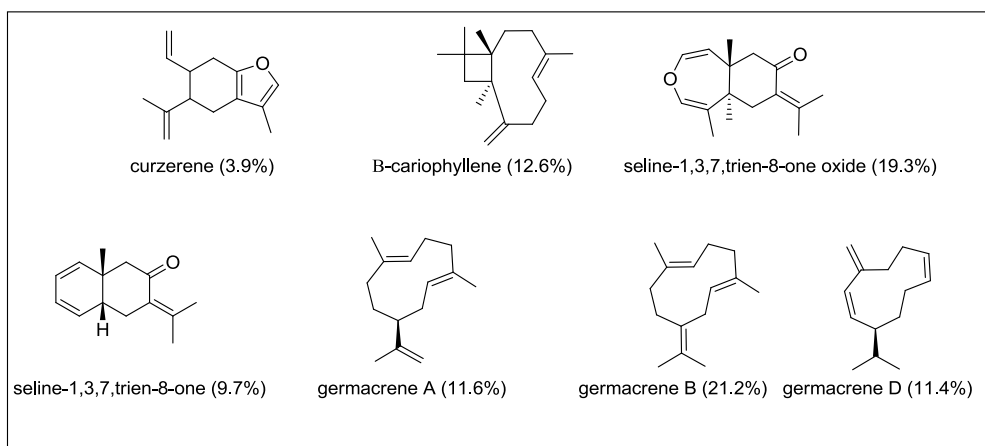


Figure 1: Major components of *E. uniflora* L. leaves EO

Biochemical parameters

Effect of the oral administration of AA and E. uniflora EO on thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

AA increased the lipid peroxidation on liver of mice, measured by the amount of MDA levels in tissue, when compared with control group ($p < 0.05$). The administration of the EO of *E. uniflora* (200 mg/kg) restored the effect caused by the AA, when compared to the AA group ($p < 0.05$) (Figure 2A), by decreasing the levels of lipid peroxidation on mice's liver.

As can be seen on Figure 2B, the administration of AA increased significantly the levels of MDA on the kidneys of mice, when compared to the control groups ($p < 0.01$). *E. uniflora* EO decreased the levels of MDA in the kidneys, founded before the administration of AA, when compared with control group ($p < 0.001$). Two-way ANOVA of TBARS on kidneys of mice revealed a significant AA x EO of *E. uniflora* interaction ($F(1,16) = 13.87$, $p = 0.0018$).

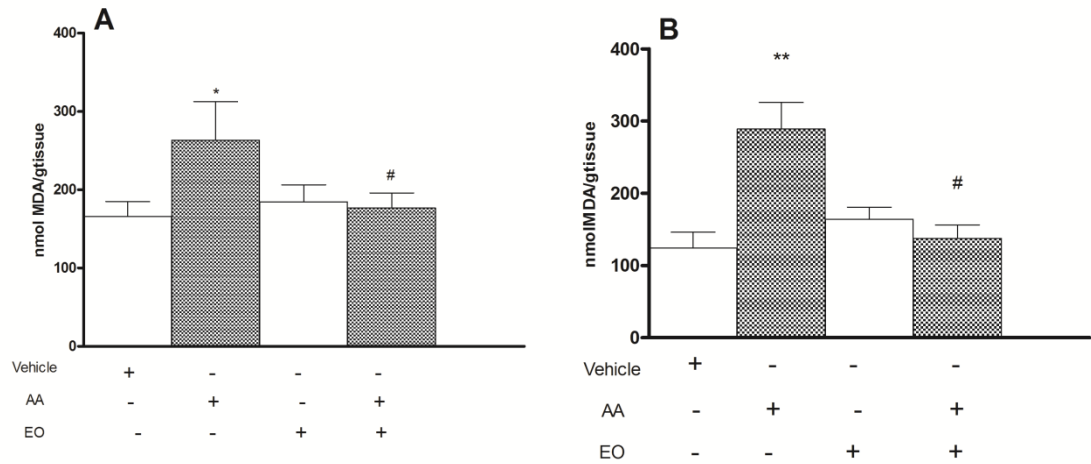


Figure 2: Effect of treatment with *E. uniflora* leaves EO on (A) hepatic and (B) renal TBARS levels of mice exposed to AA. Data are reported as mean $\pm$ SD of eight animals per group and were analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test. One asterisk represents significant effect ($p < 0.05$) and two asterisks represents ($p < 0.001$) compared to the vehicle group. (#) Denote significant difference ($p < 0.001$) from the AA group.

Effect of the administration of AA and E. uniflora EO on the α -Aminolevulinic acid dehydratase (α -Ala-D) activity

Post-hoc comparison demonstrated that AA increased α -Ala-D activity in the liver of mice, when compared to the control group ($p < 0.01$). The treatment of mice with EO of *E. uniflora* restored the activity of hepatic α -Ala-D, compared to the AA group ($p < 0.05$), as can be seen on Figure 3A.

The activity of δ -Ala-D in kidneys was not altered by the administration of AA (Figure 3B).

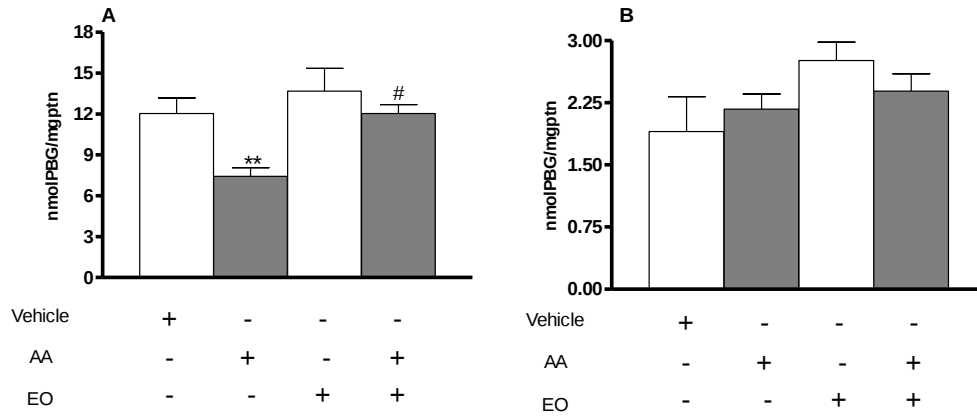


Figure 3: Effect of treatment with *E. uniflora* leaves EO on (A) hepatic and (B) renal δ -Ala-D activity of mice exposed to AA. Data are reported as mean $\pm$ SD of eight animals per group and were analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test. Two asterisks represents significant effect ($p < 0.01$) compared to the vehicle group. (#) Denotes significant difference ($p < 0.001$) from the AA group.

Effect of the administration of AA and E. uniflora EO on non-protein thiol groups

AA decreased significantly the levels of NPSH in liver of mice, when compared to the control group ($p < 0.05$). Moreover, the EO of *E. uniflora* leaves reduced the toxic effect of AA, by increasing the levels of NPSH on liver of mice, when compared to the AA group ($p < 0.01$). Two-way ANOVA of the levels of NPSH on the liver of mice revealed a significant AA X EO of *E. uniflora* ($F (1.34) = 5.31$, $p = 0.027$), as shown on Figure 4A.

The administration of AA did not alter the levels of NPSH on the kidney of mice (Figure 4 B).

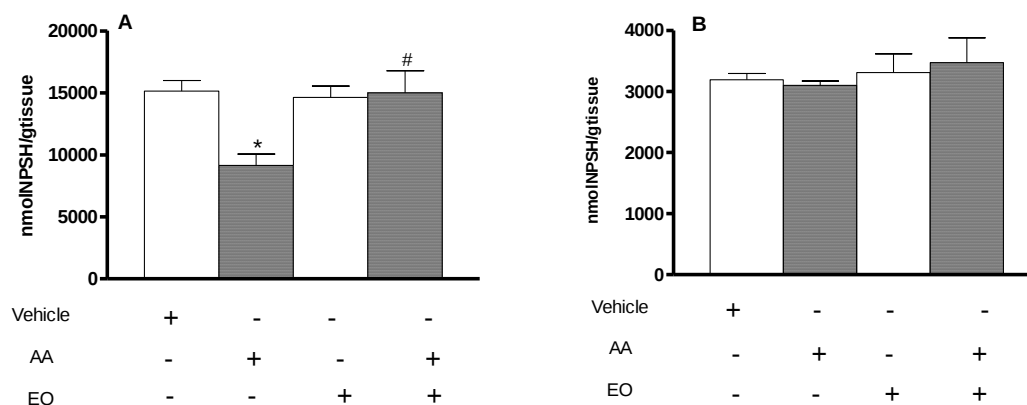


Figure 4: Effect of treatment with *E. uniflora* leaves EO on (A) hepatic and (B) renal NPSH levels of mice exposed to AA. Data are reported as mean $\pm$ SD of eight animals per group and were analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test. One asterisk represents significant effect ($p < 0.05$) compared to the vehicle group. (#) Denotes significant difference ($p < 0.001$) from the AA group.

Effect of the administration of AA and E. uniflora EO on GST activity

The activity of hepatic GST was significantly increased by the AA administration when compared to the control group ($p < 0.01$). The administration of EO of *E. uniflora* significantly decreased the activity of the hepatic GST ($p < 0.001$), as showed on Figure 5A. Two- way ANOVA revealed a significant AA X EO of *E. uniflora* interaction ($F(1,25) = 14.49$, $p = 0.0008$).

Renal GST activity was not altered by the AA administration (Figure 5B).

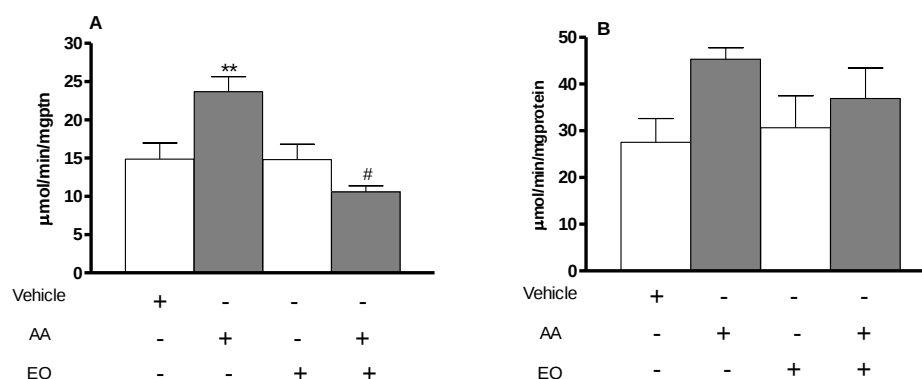


Figure 5: Effect of treatment with *E. uniflora* leaves EO on (A) hepatic and (B) renal GST activities of mice exposed to AA. Data are reported as mean $\pm$ SD of

eight animals per group and were analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test. Two asterisks represents significant effect ($p < 0.05$) compared to the vehicle group. (#) Denote significant difference ($p < 0.001$) from the AA group.

Effect of oral administration of AA and E. uniflora EO on catalase activity

Catalase activity remained unaltered in the liver and kidney of mice that received AA or EO (Data not show).

Effect of treatment with AA and E. uniflora EO on plasmatic AST and ALT activities

Plasma AST, a hepatic damage marker, was significantly increased by the AA administration, when compared to the control group ($p < 0.001$). Post-hoc comparison demonstrated that the *E. uniflora* leaves EO decreased AST activity ($p < 0.001$), when compared to the AA group, restoring the levels of plasmatic AST to those found before the administration of AA (Table 1) Two-way ANOVA indicated a significant AA X EO of *E. uniflora* interaction ($F(1,29) = 12.47$, $p = 0.0014$).

The levels of plasmatic ALT were increased by the AA administration, compared to the control group ($p < 0.001$). The *E. uniflora* EO restored the levels of ALT in plasma, when compared to the AA group, as can be seen on Table 1. Two-way ANOVA revealed a significant interaction between AA X EO ($F(1,29) = 15.10$, $p < 0.0006$).

Table 1. Effect of the treatment with AA and *E. uniflora* leaves EO on the catalase activity and the plasmatic levels of AST and ALT in mice

Group	CAT activity (U/mg ptn)		AST (U/ml)	ALT (U/ml)
	Liver	Kidney		
Control	2.27± 0.36	1.05 ± 0.73	155.30 ± 26.4	31.54 ± 19.50
AA	1.81± 0.63	0.9 ± 0.50	230.40 ± 43.80***	149.00 ± 76.12***
EO	2.42± 0.36	1.01 ± 0.08	155.30 ± 43.34	24.20 ± 13.80
AA + EO	2.17± 0.16	0.80 ± 0.21	155.60 ± 28.90 [#]	29.90 ± 14.60 [#]

The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) (n= 6). The values were analyzed by two-way ANOVA; three asterisks represents significant effect ($p < 0.001$) compared with group 1 (control). # represents significant difference ($p < 0.001$) compared with group 2 (AA).

Effect of E. uniflora leaves EO on basal lipid peroxidation

The antioxidant effect of EO was evaluated on liver and kidney of mice. The data show that EO reduced basal lipid peroxidation on liver of mice at concentrations equal and higher than 50 $\mu\text{g/ml}$; however, in the kidneys the EO did not increased lipid peroxidation levels, as can be seen on Table 2.

Table 2. Effect of *E. uniflora* L. leaves EO on basal lipid peroxidation

Concentration	Lipid peroxidation (nmol MDA/g tissue)	
	Liver	Kidney
Control	791.8 $\pm$ 69.5	559.4 $\pm$ 101.5
10 $\mu\text{g/ml}$	676.4 $\pm$ 112.6	580.1 $\pm$ 154.4
50 $\mu\text{g/ml}$	393.5 $\pm$ 109.6 *	561.6 $\pm$ 138.5
100 $\mu\text{g/ml}$	338.0 $\pm$ 131.8 *	343.2 $\pm$ 177.9
500 $\mu\text{g/ml}$	291.6 $\pm$ 158.5 **	418.6 $\pm$ 140.6

The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) (n= 3). The values were analyzed by one-way ANOVA; one asterisk represents significant effect ($p < 0.05$) and two asterisks represents significant effect ($p < 0.01$) compared with control.

Comet assay

The results obtained on comet assay on peripheral blood and bone marrow are summarized on Table 3. In this study the oral administration of a single dose of EO did not induces any genotoxic damage on the mice blood and bone marrow cells at doses ranging from 10 to 500 mg/kg when compared to the control group (canola oil). The positive control MMS, a genotoxic compound that reacts with the more nucleophilic sites of DNA to form alkylated bases, caused DNA damage in both, blood and bone marrow cells, when compared to the control group, as can be seen on Table 3.

Table 3: Damage index of the comet assay in peripheral blood and bone marrow of mice treated with a single dose of *E. uniflora* leaves EO

The data are expressed as mean $\pm$ standard error mean (SEM) (n= 6). The values of peripheral blood were analyzed by Kruskal-Wallis, followed by the Dunn's multiple comparison test, and the data of bone marrow were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test; two asterisks represents significant effect ($p < 0.01$) compared with control group.

DNA nicked assay

E. uniflora leaves EO did not induces any change on super coiled form of DNA in all tested concentrations (10 – 500 $\mu\text{g/ml}$), as can be seen on Figure 6,

Groups	Damage index (%)	
	Peripheral blood	Bone marrow
Control	3.2 ± 1.98	19.0 ± 7.81
10 mg/kg	8.0 ± 2.14	31.8 ± 9.22
100 mg/kg	6.8 ± 1.53	50.2 ± 14.90
500 mg/kg	5.6 ± 1.43	37.2 ± 13.50
MMS (200 mg/kg)	$127.0 \pm 11.22^{**}$	$143.7 \pm 44.8^{**}$

lanes 3-10, comparing tolanes 11 and 12, that describe the damage caused by $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ on super coiled DNA.

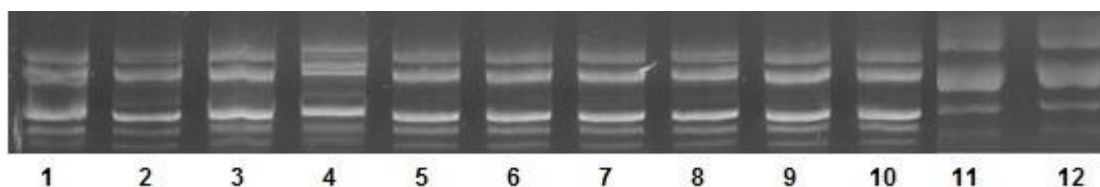


Figure 6: Effect of *E. uniflora* leaves EO on super coiled DNA. Lanes 1 and 2, native super coiled DNA; lanes 3-4, PEG (vehicle); lanes (5-6): EO 10 mg/kg; lanes 7-8, EO 100 mg/kg; lanes 9-10, EO 500 mg/kg and lanes 11-12, DNA + $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$.

Discussion

Here, we have shown that exposure to AA increases lipid peroxidation in liver and kidney by enhancing TBARS and decreasing NPSH levels in liver of mice. In addition, AA exposure also causes a decrease on the α -aminulevunilic acid dehydratase activity, and an increase on the glutathione S-transferase

activity on mice's livers. An increase on plasma AST and ALT activities also was observed. Taken together, these results show the liver injury caused by AA (300 mg/kg).

Furthermore, the administration of *E. uniflora* leaves EO (200 mg/kg) restored all of the biochemical parameters modified by the injury caused by the AA on liver of mice, and also decreases the levels of MDA on kidneys, demonstrating the potential of the essential oil as a natural antioxidant.

A previous chemical report of the EO obtained of the leaves of *E. uniflora* revealed that its major constituents were seline-1,3,7-trien-8-one and its oxide, germacrones, furanodiene and curzerene (Weyerstah et al. 1988), with prevalence of oxygenated and non-oxygenated sesquiterpenes. An exception was observed in the *E. uniflora* tree from Argentine, which presented monoterpenes as the major components (Henriques et al. 1993). Our findings revealed that the major compounds of the *E. uniflora* leaves EO are: germacrene B (21.2%), seline-1,3,7-trien-8-one oxide (19.3%), β -cariophyllene (12.6%), germacrene A (11.6%), germacrene D (11.4%), seline-1,3,7-trien-8-one (9.7%) and curzerene (4%), which accounts about 90 % of the EO total content. Chemical variations on the *E. uniflora* EO composition may be a result of different chemotypes, geographic and seasonality differences and the use of diverse EO extraction methods (Burt et al. 2004).

The changes caused by the AA administration indicate a decrease in the intracellular antioxidant capability, which can be, at least in part, responsible for the oxidative stress. Previous studies showed that several factors could be involved in the mechanism of pathophysiology of AA hepatotoxicity at the cellular level. However, the role of oxidative stress was reported to be one of the most important facts in the development of hepatic cell injury (Knight et al. 2001). These results are in agreement with recent evidences that demonstrate that oxidative stress by the ROS production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction are all involved in AA-induced hepatotoxicity (Chandrasekaran et al. 2008; 2010).

In the present study, we have demonstrated that the oral administration of a single dose of the *E. uniflora* leaves EO (200 mg/kg) reverts all the toxicological parameters changed by the AA administration, like TBARS in liver

and kidney, δ -Ala-D activity, NPSH and GST activity in liver. Moreover, the EO reverted the levels of plasmatic AST and ALT.

Lipid peroxidation is known to have deleterious effects on structure and function of cell membranes (Gupta et al. 1991). Considering that unsaturated fatty acids, which undergo peroxidation, are important constituents of biological membranes, structural and functional deterioration of biological membranes can result in irreversible damages. The levels of malondialdehydes (MDA) were significantly increased by the AA administration in liver and kidney; this increase is in agreement with the finding by others (Ávila et al. 2011; Katikova et al. 2002; Wilhelm et al. 2009). This finding supports the hypothesis that oxidative damage, which is associated with lipid peroxidation, is a crucial step in AA hepatotoxicity (Younes et al. 1986). The ability of the *E. uniflora* leaves EO to reduce AA-induced lipid peroxidation might be a result of its antioxidant properties (Victoria et al. 2012).

One important finding in this work was the observation that the *E. uniflora* leaves EO neutralized the inhibitory effect of AA on α -Ala-D activity. α -Ala-D is an enzyme susceptible to a variety of treatments that are associated with oxidative stress and for this reason it is being used as a biomarker. In its active site there are two cysteinyl residues that can be easily oxidized by several agents (Farina et al. 2003; Nogueira et al. 2004). The mechanism underlying the enzyme inhibition is not fully understood, probably, the reactive metabolite of AA (NAPQI) can also react directly with essential-SH groups of α -Ala-D, inactivating the enzyme and causing oxidative stress, as demonstrated by Rocha et al. (2005).

The effect of AA on non-protein-SH content is certainly related to depletion of glutathione (GSH) that accounts for about 90 % of non-protein-SH in liver (LeBoeuf and Hoekstra, 1983). In this study the levels of NPSH were significantly reduced on the liver of mice treated with AA. Additionally, the *E. uniflora* leaves EO abolished the decrease of liver NSPH. According to Rocha et al. (2005), the depletion of GSH seems to be a cellular event that precedes AA toxicity and reduction in liver SH groups is a common finding after AA intoxication.

We also found that AA increased the activity of GST, while the *E. uniflora* leaves EO neutralized the increment on the enzyme activity. GST is a multifunctional enzyme involved in cellular detoxification of endogenous metabolites, superoxide radicals and exogenous toxic chemicals (Zimniak, 2006). The depletion of GSH and the increase of the GST activity are related with liver mechanisms of AA detoxification, since GST catalyzes the conjugation of GSH with xenobiotics, in this case, NAPQI (Raza, 2011).

The hepatic injury caused by AA was manifested by quantitative elevation of serum AST and ALT. The plasmatic aminotransferase activities have long been considered as sensitive indicators of hepatic damage (Molander et al. 1955). In necrosis or membrane damage, the enzymes are released into circulation and they can be therefore measured in serum (Sheeba et al. 2010). ALT catalyzes the conversion of alanine to pyruvate and glutamate and is released in a similar manner; ALT is more specific cytosolic enzyme for liver, whereas AST is released into circulation in the early phase of injury, being less specific to liver injury (Rej et al. 1978). Elevated levels of plasmatic enzymes are indicative of cellular leakage and loss of functional integrity of cell membrane in liver. The increased activities of AST and ALT in this study may be interpreted as a result of the liver cells destruction or changes on the membrane permeability, indicating the severity of hepato-cellular damage induced by AA, which is in accordance with previous reports (Fakurazi et al. 2008; Wilhelm et al. 2009). In this study the increase of the levels of plasmatic AST and ALT were reversed by the administration of *E. uniflora* leaves EO 30 min after the AA administration.

Taken together, our findings provide support for a hepatoprotective effect of *E. uniflora* leaves EO in an AA-induced hepatotoxicity model in mice and suggest a possible pharmacologic mechanism involved: the antioxidant action of the EO.

To extend the studies and provide more information about the in vitro antioxidative effect of the *E. uniflora* leaves EO, we evaluated its effect in the basal lipid peroxidation on liver and kidneys of mice. The data demonstrated that EO reduces the basal lipid peroxidation on liver of mice. These results are in accordance with previous results of our group regarding the antioxidant effect

of *E. uniflora* EO (Victoria et al. 2012) and it can also be related with the mechanism of hepatoprotective effect of EO against a liver injury caused by acetaminophen. Besides, many studies have described the action of several antioxidants in many different models of acetaminophen intoxication (Ávila et al. 2011, Wilhelm et al. 2009).

Previous studies have also indicated that some substances present in medicinal plants are potentially toxic and carcinogenic (de Sá-Ferreira and Vargas, 1999), and it has also been reported that some traditional medicines may have a genotoxic potential (Demma et al. 2009; Cavalcanti et al. 2006; Romero-Jimenez et al. 2005). Assessment of the potential genotoxicity of traditional medicines is indeed an important issue, since damage to genetic material may lead to critical mutations and therefore to an increased risk of cancer and other diseases (Demma et al. 2009). Thus, in this study we demonstrated for the first time the effect of *E. uniflora* leaves EO on the comet and DNA nicked assay.

The comet assay test is especially relevant for genotoxicity, because it allow consideration of factors of in vivo metabolism, pharmacokinetics and DNA repair process (Krishna et al. 2000). This test detects DNA strand breaks, alkali-labile sites and incomplete excision repair events in individual cells. It is a rapid and sensitive method for the detection of DNA damage induced in vitro or in vivo by various agents in a variety of cells (Collins, 2004; Moller, 2006; Tice et al. 2000). The mice exposed to different doses of EO did not present any DNA damage in peripheral blood and bone marrow cells detected in this assay. In addition, it was evaluated the effect of the EO on super coiled DNA. The results demonstrated that the *E. uniflora* leaves EO did not induces any brake on super coiled DNA, indicating no oxidative damage. Taking together, the data of DNA nicked and comet assay, it is possible infer that the EO does not induce oxidative damage and toxic effects on prokaryotic and eukaryotic DNA.

Conclusion

In summary, the treatment with a single dose of *E. uniflora* leaves EO compensated the toxic effects of AA on mice and this beneficial effect is probably related with antioxidant properties of this EO. Furthermore, the EO

reduces the basal lipid peroxidation in liver of mice and was not genotoxic in the DNA nicked and comet assay.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (Grant 472644/2010-6), CAPES and FAPERGS (PRONEX 10/0027-4, PRONEM 11/2026-4, PqG 1012043) L.S., E.J.L. are recipients of CNPq fellowships. To researchers of Embrapa Clima Temperado, Dr. R. Franzon and M. Vizzoto.

References

Anderson D., Yu T. W., Phillips B.J., Schmerzer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research* 1994; 307: 291 – 8.

Ávila D. S., Palma A. S., Colle D., Scolari R., Manarin F., Silveira A. F., Nogueria C. W., Rocha J. B. T., Soares F. A. A. Hepatoprotective activity of a vinylic telluride against acute exposure to acetaminophen. *European Journal of Pharmacology* 2011; 661: 91 – 101.

Bhadauria M. Dose-dependent hepatoprotective effect of emodin against acetaminophen-induced acute damage in rats. *Experimental and Toxicology Pathology* 2010; 62: 627 – 35.

Cavalcanti B. C., Costa-Lotufo L. V., Moraes M. O., Burbano R. R., Silveira E. R., Cunha K. M. A., Rao V. S. N., Moura D. J., Rosa R. M., Henriques J. A. P., Pessoa C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 388 – 92.

Chandrasekaran V. R., Chien S. P., Hsu D. Z., Chang Y. C., Liu M.Y. Effects of sesame oil against after the onset of acetaminophen-induced acute hepatic injury in rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2010; 34: 567 – 73.

Chandrasekaran V. R., Wan C. H., Liu L. L., Hsu D. Z., Liu M. Y. Effect of sesame oil against acetaminophen-induced acute oxidative hepatic damage in rats. *Shock* 2008; 30: 217 – 21.

Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 2004; 26: 249 – 61.

Dahlin D. C., Miwa G. T., Lu A. Y., Nelson S. D. N-acetyl-p benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of National Academy of Sciences U. S. A.* 1984; 81: 1327 – 31.

Dargan P., Jones A. Paracetamol: balancing risk against benefit, *QMJ* 2002; 95: 831– 2.

De Sá-Ferreira I. C. F., Vargas V. M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. *Phytotherapy Research* 1999; 13: 397 – 400.

Demma J., Engidawork E., Hellman B. Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 122: 136 – 42.

Fakurazi S., Hairuszah I., Nanthini U. *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level, *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 2611 – 15.

Gupta A., Hasan M., Chander R., Kapoor N.K. Age-related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous systems of rats. *Gerontology* 1991; 37: 305 – 9.

Halliwel B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4. ed. Clarendon Press, Oxford, 2006.

Henriques A. T., Sobral M. E., Cauduro A. D., Schapoval E. E., Bassani V. L., Lamaty G., Menut C., Bessiere J. M. Aromatic plants from Brazil, The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 1993; 5: 501 – 5.

Jaeschke H., Knight T. R., Bajt M. L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters* 2003; 144: 279 – 88.

James L. P., McCullough S. S., Knight T. R., Jaeschke H., Hinson J. A. Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of

peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. Free Radical Research 2003; 37: 1289 – 97.

Katikova O. I. Effect of mexidol on the homeostasis and lipid peroxidation in paracetamol poison, Eksp. Klin Farmakol 2002; 65: 53 – 6.

Knight T.R., Kurtz A., Bajt M. L., Hinson J. A., Jaeschke H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. Toxicological Sciences 2001; 62: 212 –20.

LeBoeuf R. A., Hoekstra W. G. Adaptive changes in hepatic glutathione metabolism in response to excess selenium in rats. Journal of Nutrition 1983; 113: 845 – 54.

Lee J. C., Kim H. R., Kim J., Jang Y. S. J. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of opuntia ficus-indica Var. Saboten. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 50: 6490 – 96.

Marnett L.J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 2000; 21: 361–70.

Mitchell J. R., Jollow D. J., Potter W. Z., Davis D. C., Gillette J. R., Brodie B. B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis-I. Role of drug metabolism. Journal of Pharmacology and Experimental Therapy 1973; 187: 185 - 94.

Molander, D. W., Wroblewski, F., Ladue, J. S., 1955. Serum glutamic oxalacetic transaminase as an index of hepatocellular integrity, Journal of Laboratory and Clinical Medicine 46, 831 – 839.

Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. Basic Clinical Pharmacology and Toxicology 2006; 98: 336 – 45.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 1979; 95: 351 – 8.

Rej R. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. Clinical Chemistry 1978; 24: 1971 –9.

Romero-Jimenez M., Campos-Sanchez J., Allana M., Munoz-Serrano A., Alonso- Moraga A. Genotoxicity and antigenotoxicity of some traditional medicinal herbs. Mutation Research 2005; 585: 147 – 55.

Sheeba Rani, M., Emmanuel S., Raja Sreekanth M., Ignasimuthu S. Evaluation of in vivo antioxidant and hepatoprotective activity of *Cassia*

occidentalis Linn. against paracetamol induced liver toxicity in rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2010; 2: 67 – 70.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 1988; 175: 184 – 91.

Song F. L., Gan R. Y., Zhang Y., Xiao Q., Kuang L., Li H. B. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. International Journal of Molecular Sciences 2010; 11: 2362 – 72.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis 2000; 35: 206 – 21.

Victoria F. N., Lenardão E. J., Savegnago L., Perin G., Guimarães R. J., Motta A. S., Silva W. P., Nascente P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties, Food and Chemical Toxicology 2012; 50: 2668 – 74.

Weyerstahl P., Marschall-Weyerstahl H., Christiansen C., Oguntimein O., Adeoye A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. Planta Medica 1988; 54: 546 – 9.

Whilhelm E. A., Jesse C. R., Leite M. R., Nogueira C. W. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Pathophysiology 2009; 16: 31 – 7.

Younes M., Cornelius S., Siegers C.P. Ferrous ion supported in vivo lipid peroxidation induced by paracetamol—its relation to hepatotoxicity, Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology 1986; 51: 89 – 99.

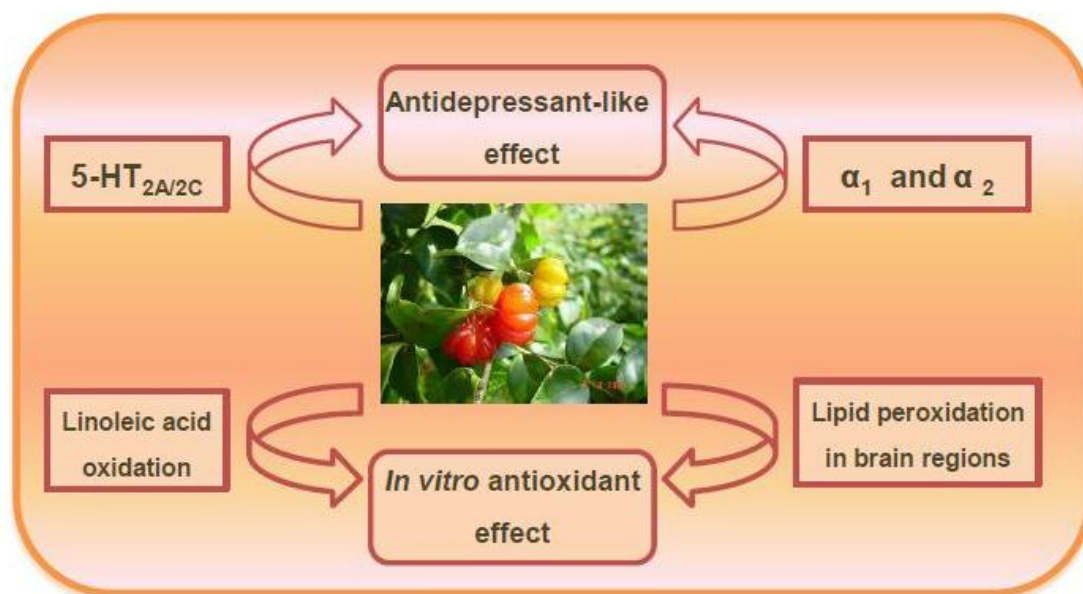
Zimniak P. Substrate and reaction mechanism of GSTs. In Toxicology of Glutathione Transferases, Taylor & Francis CRC Press, Boca Raton, FL., 71 – 102, 2006.

5.3 Envolvimento dos sistemas serotoninérgico e adrenérgico no efeito antidepressivo do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* e análises complementares sobre a atividade antioxidante

O seguinte trabalho foi submetido para o periódico *Neuroscience Letters* e está formatado de acordo com as normas da revista.

Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity

Francine Novack Victoria, Arthur de Siqueira Brahm, Lucielli Savegnago,
Eder João Lenardão.



ABSTRACT

Many studies have addressed the effect of plant-derived essential oils (EO) on the central nervous system and the potential as natural antidepressants. In this work we evaluated antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves EO employing the tail suspension test (TST). The involvement of serotonergic and adrenergic systems in the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. EO was appraised. EO administered by oral route (p.o.) in mice at doses of 10 and 50 mg/Kg exhibited antidepressant-like action in the TST. The effect of EO (10 mg/kg, p.o.) was prevented by pretreatment of mice with ketanserin (5mg/kg, intraperitoneal), a non selective antagonist of 5-HT_{2A/2C} receptors, prazosin (1 mg/kg, i.p.), a selective antagonist of α_1 receptor and yohimbine (1 mg/kg, i.p.), a selective antagonist of α_2 receptors. In addition, further analysis of the *in vitro* antioxidant effect of the EO was made against lipid oxidation. The results revealed that EO had a potent antioxidant activity by inhibition of lipid peroxidation and therapeutic potential for the development of phytomedicines with antidepressant and antioxidant properties.

Key words: essential oil, antidepressant-like, antioxidant, *Eugenia uniflora*

Depression is one of the most commonly diagnosed mental disorders among adults and is characterized by a wide range of debilitating emotional and physical symptoms such as changed mood, lack of interest in the surroundings and physical impairment [2]. Numerous neural pathways are involved in the pathophysiology of depression, and a great number of neurotransmitters participate in the primary mechanisms of drugs action [5]. Depression has been estimated to affect up to 21% of the world's population and according to WHO's prediction, it will be the second most common disease in 2020 [30].

Some authors have suggested the involvement of oxidative stress in neurological and psychiatric disorders [15]. The oxidative stress occurs when redox homeostasis is challenged by free radicals and reactive oxygen species (ROS), due to either overproductions or deficiencies in antioxidants defenses. The brain is particularly vulnerable to oxidative damage, since it has a comparatively high oxygen consumption, modest antioxidant defenses, a lipid-rich constitution, the presence of redox-catalytic metals such iron and copper, and neurotransmitters with reducing potential [18]. The vulnerability of the brain and the association between neurodegenerative changes and psychiatric disorders suggest that oxidative damage mechanisms may be implicated in the pathogenesis of depression, and that antioxidant supplementation may be a target in this treatment [6].

In the search for new molecules useful for the treatment of neurological disorders, medicinal plants have emerged as a source for the development of drugs, demonstrating pharmacological potential to treat neurological disorders, and playing an important role for patients who respond poorly to conventional treatments [9].

In fact, many studies have addressed the potential of plant-derived essential oils on the central nervous system, as natural antidepressants, to relieve anxiety, and stress [17]. Essential oils (EOs) are natural products generally obtained from medicinal plants that exhibit a variety of pharmacological properties [3].

The leaves of *Eugenia uniflora* L., popularly known as “pitanga”, are used in Brazilian folk medicine in the treatment of rheumatism, stomach diseases, disorders of the digestive tract, hypertension, yellow fever and gout; and also to diminish blood pressure, lower blood glucose level and as a diuretic [1, 30].

Additionally, we have recently reported the antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the pitanga leaf EO and we observed that this EO do not show acute toxicity, with a LD₅₀ higher than 200 mg/kg [28]. Based on these promising results and to extend our studies about *E. uniflora* leaves EO, the aim of this study was firstly evaluate the antidepressant-like effect of the EO and the possible involvement of serotonergic and adrenergic systems; moreover the *in vitro* antioxidant effect of the *E. uniflora* L. leaves EO was study against lipid oxidation.

Male Swiss mice of 2-3 months old (25 – 30g) were maintaining at 22 – 25 °C, under 12h:12h light/ dark cycles, with free access to food and water. All experiments were performed with separate groups of animals (n=6 animals) and each animal was used only once. The experimental protocol was in compliance with National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments (CEEA 2622).

The essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L. was obtained by hydro-distillation and the chemical composition of essential oil was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC/MS).

For the *in vitro* assays, EO was dissolved in dymethyl sulfoxide (DMSO), and for the *in vivo* assays all drugs were administered in a constant volume of 10ml/kg body weight and diluted in canola oil. The drugs (positive control and antagonists) were dissolved in saline and Control animals received appropriate vehicle.

For the evaluation of the antidepressant-like effect, the animals were pre-treated with different doses of EO (1-50 mg/kg, per oral, (p.o.), fluoxetine (32 mg/kg, p.o.) or canola oil (10 ml/kg) 60 min before of the tail suspension test (TST). In the TST, animals are placed in an inescapable situation and the antidepressant-like activity is expressed by the decrease of immobility time, an effect that is exhibited by conventional antidepressants [13], this test is a well characterized behavioral model predictive of antidepressant activity.

The total immobility time induced by tail suspension was measured according to the method described by Steru [26]. The mice were suspended on the edge of a table 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time, defined as the absence of escape-oriented behavior, was scored over 6 min as previously described [26].

In order to investigate the possible involvement of serotonergic system on the antidepressant-like effect of the EO on the TST in mice, distinct groups of animals were pre-treated with different antagonists. Animals were pre-treated with WAY-100635, a selective antagonist of 5-HT_{1A} receptors (0.1 mg/kg,

subcutaneous, s.c.), ketanserin a non-selective antagonist of 5-HT_{2A/2C} receptors (5mg/kg, intraperitoneal, i.p) or ondansetron, a selective antagonist of 5-HT₃ receptors (1mg/kg, i.p.), 15 min before the administration of the EO (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (canola oil).

To address the possible involvement of the adrenergic system in the antidepressant-like effect of EO, animals were pre-treated with prazosin (1 mg/kg, i.p.), a selective antagonist of α_1 adrenergic receptor, yohimbine (1 mg/kg, i.p.), a selective antagonist of α_2 adrenergic receptor or vehicle and after 15 min they received EO (10 mg/Kg, p.o.) or vehicle and were tested in the TST 1h later.

The locomotor and exploratory behavior was assessed in the open field test (OFT). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 5 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory activities (expressed by the number of time rearing on the hind limbs) [29]. The animals were pre-treated with *E. uniflora* EO (1-50 mg/Kg, p.o.) and, after one hour, they were observed in the OFT.

Considering the role of oxidative stress on pathophysiology of depression and to extend our studies about the *in vitro* antioxidant effect of the *E. uniflora* L. leaves EO, we evaluated the effect of the EO on: linoleic acid peroxidation assay and SNP-induced lipid peroxidation on hippocampus, cortex and cerebellum of mice. These brain structures were used since they are implicated in the pathogenesis of depression (cortex and hippocampus) [25] while cerebellum has been indicated as an area under negative functional connectivity from the hippocampus seen in depressive subjects [33].

Linoleic acid was used as a lipid matrix to evaluate the effect of EO on Fe^{2+} -ascorbic acid- induced lipid peroxidation. The ability of EO (10-500 $\mu\text{g/ml}$) to inhibit the linoleic acid peroxidation was determined by the method of Choi [11] with modifications at 532 nm using n-butanol as blank.

To evaluate the effect of *E. uniflora* L. EO in the lipid peroxidation on the hippocampus, cortex and cerebellum the levels of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation were used as a biomarker. For this purpose, mice were euthanized by cervical dislocation and cerebral tissue was rapidly removed, and the hippocampus, cortex and cerebellum were separated. After that, the tissues were immediately homogenized, centrifuged, the pellet was discarded, and a low-speed supernatant (S_1), was used to determine the effects of different concentrations of EO on sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation.

Sodium nitroprusside (SNP) was used as a classical inductor of lipid peroxidation [23] and the levels of MDA were determined spectrophotometrically by the thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS) according to the protocol of Ohkawa [21] with major modifications.

The results are presented as means $\pm$ standard error mean (SEM). Statistical analysis was performed using a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the appropriate multiple comparison tests. The *in vitro* assays was performed in duplicate and repeated at least three times; for the *in vivo* assays, six animals were used per group. Differences were considered statistically significant at a p value of 0.05. The IC_{50} (concentration of sample required to inhibit 50% of lipid peroxidation) and ID_{50} (dose necessary

to reduce in 50% the immobility time when compared to the control group) values were calculated from the graph of %inhibition *versus* concentration.

The chemical composition of the EO was analyzed by GC/MS. The gas chromatogram of the EO permitted the identification of seven compounds that comprised approximately 90% of all constituents of EO. The EO contains mainly no-oxygenated sesquiterpenes, followed by oxygenated ones. The major compounds in the EO are germacrene B (22%), seline-1,3,7-trien-8-one-oxide (19%), β -cariophyllene (13%), germacreno A (11.6%), germacreno D (11.4%), seline-1, 3,7-trien-8-one (9.5%) and minor concentration of curzerene (4%).

The EO reduced significantly the immobility time at doses equal and higher than 10 mg/kg (58.9% decrease), while fluoxetine reduced by 56.3% (Figure 1) when compared to the control group (canola oil). The ID_{50} was 9.1 ± 1.2 mg/ml and the maximum inhibition (I_{max}), of the EO on the TST was $72.8 \pm 17.1\%$.

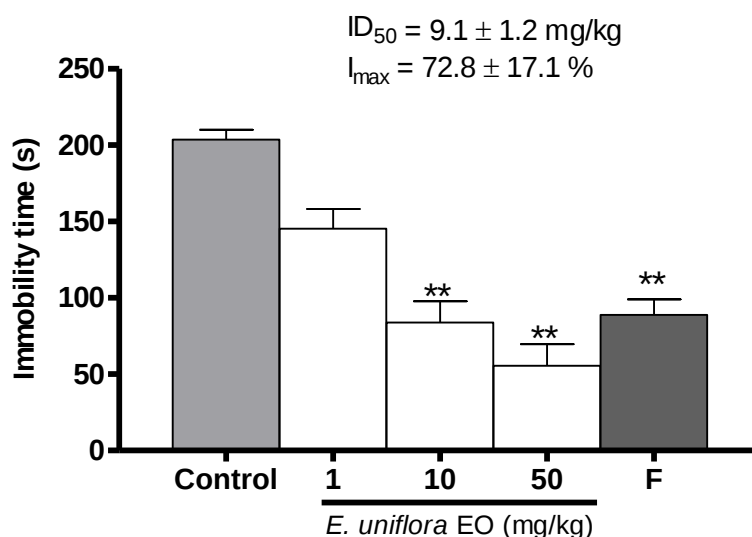


Figure 1: Effect of acute administration of *E. uniflora* EO on immobility time in the tail suspension test. F is the positive control fluoxetine (32 mg/kg, p.o.). The values are present as mean $\pm$ standard error mean (SEM) (n = 6). Three

asterisks represent $p < 0.001$ when compared to the control group by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test.

Pre-treatment of mice with ketanserin prevents the anti-immobility action of the EO. A two-way ANOVA revealed a significant interaction between the pre-treatment and the treatment ($F(1,10) = 8.66$, $p = 0.0147$), as can be seen on Figure 2. On the other hand, the pre-treatment of mice with WAY100635 ($F(1,14) = 2.53$, $p = 0.133$) and ondansetron ($F(1,18) = 0.01$, $p = 0.907$) did not block the antidepressant-like effect of *E. uniflora* leaves EO (Figure 2A, 2C).

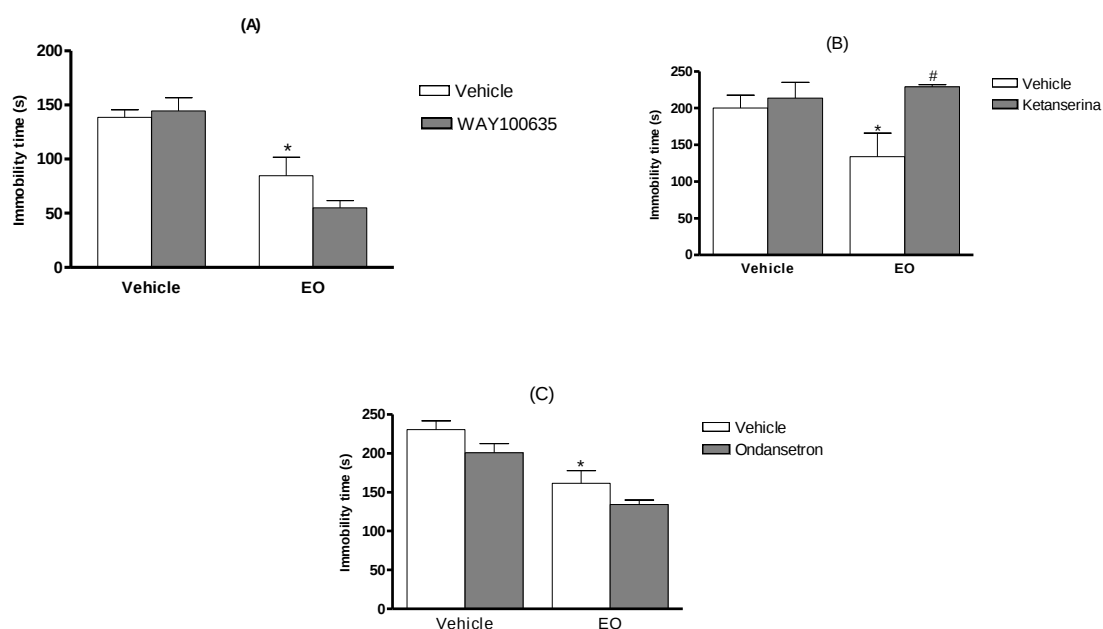


Figure 2: Effect of pre-treatment of mice with (A) WAY100635, (B) ketanserin and (C) ondansetron on the antidepressant-like effect of the *E. uniflora* leaves EO. The values are presented as mean $\pm$ standard error mean (SEM) ($n = 6$). One asterisk represents $p < 0.05$ when compared to the vehicle group and (#) represents $p < 0.01$ when compared with *E. uniflora* L leaves EO group by two-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test.

The pretreatment with adrenergic antagonists revealed that both blocked the antidepressant-like effect of EO, increasing the immobility time when compared to the *E. uniflora* L. EO group (Figure 3). Two-way ANOVA revealed a significant interaction between the pre-treatment with prazosin and the treatment with EO ($F(1,15) = 7.11$, $p = 0.0176$) and between yohimbine and EO treatments ($F(1,13) = 12.84$, $p = 0.003$).

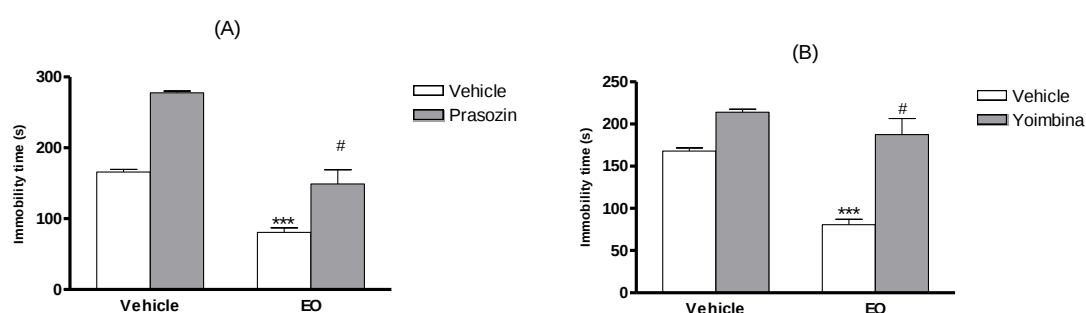


Figure 3: Effect of pre-treatment of mice with (A) prazosin and (B) yohimbine on the antidepressant-like effect of the *E. uniflora* leaves EO. The values are presented as mean $\pm$ standard error mean (SEM) ($n = 6$). Three asterisks represents $p < 0.001$ when compared to the vehicle group and (#) represents $p < 0.05$ when compared with *E. uniflora* EO group by two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test.

Considering that the antidepressant-like activity of the *E. uniflora* leaves EO on the TST may be subjected to the presence of components that induce hyperactivity or cause a locomotor problem, given a false positive or negative effect respectively, mice were submitted to the OFT. The administration of EO did not alter significantly the locomotor and exploratory parameters when compared to the control group (data not show).

The effect of *E. uniflora* EO on the linoleic oxidation is depicted on Table 1. The EO inhibited the oxidation of linoleic acid in concentrations equal and higher than 50 µg/ml with an IC₅₀ value of 325.0 ± 66.1 µg/ml and an I_{max} of 60.5 ± 6.1 %.

Table 1: Effect of *E. uniflora* leaves essential oil on linoleic acid peroxidation induced by Fe⁺²/ ascorbic acid

EO (µg/ml)	Inhibition (%)
10	3.40 ± 3.05
50	27.23 ± 13.74*
100	36.00 ± 12.30*
500	60.67 ± 6.11**
IC ₅₀ (µg/ml)	325.0 ± 66.1
I _{max} (%)	60.5 ± 6.1

Values are presented as mean ± SEM. Asterisks represent significant difference of the induced treatment (linoleic acid + Fe⁺² + ascorbic acid, 100 % of oxidation) (*) p < 0.05, (**) p < 0.01. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test.

The SNP induced lipid peroxidation in hippocampus, cortex and cerebellum while the *E. uniflora* EO reduced SNP-induced lipid peroxidation at concentrations equal or greater than 50 µg/ml in hippocampus (I_{max} 37.5 ± 12.50 %) and 10 µg/ml in cortex (IC₅₀ 93.30 ± 5.10 µg/ml, I_{max} 53.0 ± 1.90 %) and cerebellum of mice (47.0 ± 2.80 µg/ml, I_{max} 53.0 ± 14.6 %) (Table 2).

Table 2: Effect of *E. uniflora* L leaves EO on SNP-induced lipid peroxidation

Values are presented as mean $\pm$ SEM. Asterisks represent significant difference of the induced (I, SNP + tissue) (*) $p < 0.05$ (**) $p < 0.01$ and (#) represent significant difference from the

EO	SNP-induced lipid peroxidation (nmol MDA/g tissue)		
	Hippocampus	Cortex	Cerebellum
Control	769.2 $\pm$ 23.83 *	628.90 $\pm$ 150.40 *	632.90 $\pm$ 45.24 *
Induced	1400 $\pm$ 163.2 [#]	1458.00 $\pm$ 167.20 [#]	1220.0 $\pm$ 77.91 [#]
1 μ g/ml	1744.0 $\pm$ 268.1	1793.0 $\pm$ 236.5	1437.0 $\pm$ 280.5
10 μ g/ml	888.90 $\pm$ 14.14	568.80 $\pm$ 195.00 **	758.10 $\pm$ 109.50 **
50 μ g/ml	775.10 $\pm$ 176.80 *	797.30 $\pm$ 163.90 *	586.10 $\pm$ 40.87 **
100 μ g/ml	647.80 $\pm$ 228.40 *	791.90 $\pm$ 86.10 *	515.70 $\pm$ 125.00 **
IC ₅₀ (μ g/ml)	-	93.30 $\pm$ 5.10	47.0 $\pm$ 2.80
I _{max} (%)	37.5 $\pm$ 12.5	53.0 $\pm$ 1.90	53.0 $\pm$ 14.60

control (C, tissue) ($p < 0.05$). The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple range test.

For the first time the antidepressant-like effect of *E. uniflora* EO on the TST was reported. This effect is mediated by the modulation of serotonergic and adrenergic systems. Interestingly, *in vitro* assays revealed that the EO inhibits the lipid oxidation in the assays of linoleic acid oxidation and SNP-induced lipid peroxidation in cerebral structures.

In the present work, we demonstrate that *E. uniflora* EO produced antidepressant-like effect in the TST at doses of 10 and 50 mg/kg. Recently, Colla et al. [12] studied the antidepressant-like effect of hydro-alcoholic extract of *E. uniflora* L leaves in the TST. However, the extract did not present antidepressant-like effect in the TST even at concentration of 100 mg/kg. Probably, the amount of volatile compounds present in the EO, like oxygenated

and non-oxygenated sesquiterpenes are responsible for its antidepressant-like effect.

Many studies have suggested that the activation of 5-HT₂ receptors can be related in the regulation of mood disorders [10]. These receptors are widely distributed throughout brain structures that are important on the pathophysiology of depression, like pre-frontal cortex and hippocampus [19]. Conventional antidepressants are based on the enhancement of monoamines in the brain, like serotonin, norepinephrine and dopamine that are involved in the pathophysiology of depression [14].

According with our results, the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves EO involves the modulation of receptors 5-HT_{2A/2C}, since the pre-treatment of mice with ketanserin, an antagonist of these receptors, significantly prevent the anti-immobility effect of the EO.

Besides the serotonergic, the adrenergic system is classically implicated in the pathophysiology of depression [16], and compounds that affect the adrenergic neurotransmission, such as noradrenaline reuptake inhibitors or monoamine oxidase inhibitors, are currently used to treat depression [22].

In this study, the pre-treatment of mice with prazosin, a selective antagonist of α_1 adrenoreceptor, has blocked the antidepressant-like effect of *E. uniflora* EO. Furthermore, the pre-treatment of animals with yohimbine, a α_2 adrenoreceptor antagonist, improved the immobility time of the EO. This finding indicates that α_2 is also involved in the action of EO.

Thus, the antidepressant-like effect of the *E. uniflora* EO appears to be involved, at least in part, with serotonergic and adrenergic systems.

Recent clinical evidences have showed the co-existence between increased oxidative stress and depression symptoms in patients [20]. Since the *E. uniflora* EO presented antidepressant-like effect; we extend our studies to evaluate the *in vitro* antioxidant effect of the EO.

E. uniflora EO decreased the levels of linoleic acid oxidation in concentrations ranging from 50 to 500 µg/ml and presents effect against the SNP-induced lipid oxidation on the cerebral regions studied.

Reactive Oxygen derived species (ROS) partially reduced are produced as part of normal physiological and metabolic processes in aerobic organisms. Excessive production of ROS can lead to oxidative stress, an imbalance between the pro-oxidant and antioxidant species [18]. Oxidative stress is known to affect lipid membrane through lipid peroxidation and also to oxidize proteins and DNA.

Alterations in phospholipids may induce changes in membrane viscosity and in various neurotransmitter systems like serotonin (5-HT) and noradrenaline [27]. However, it is not clear if oxidative stress, is a cause or a result of depression [7].

The present work demonstrated the antioxidant activity and the antidepressant-like effect of *E. uniflora* leaves EO mediated by the modulation of serotonergic and adrenergic systems. Altogether, these results suggest that the *E. uniflora* EO may have therapeutic value. However, more studies are necessary to elucidate others possible mechanisms involved on the antidepressant-like effect of the EO.

Acknowledgements

CAPES, CNPq, FAPERGS, PRONEX 10/0005-1, PRONEM 11/2026-4 e FINEP/SCIDT-RS.

References

[1] A. C. Adebajo, K. J. Oloke, A. J. Aladesanmi, Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*, *Fitoterapia* 50 (1989), 451 – 455.

[2] N.R. Aldous, A.M. Mann, The pathophysiology of depression, *Canadian Medical Association Journal* 89 (1963), 937– 943.

[3] R. N. Almeida, D. S. Navarro, J. M. Barbosa-Filho, Plants with central analgesic activity, *Phytomedicine* 8 (2001), 310 – 322.

[4] R. N. Almeida, D. A. M Araújo, J. C. R Goncalves, F. C. Montenegro, D. P. Sousa, J. R. Leite, R. Mattei, M. A. C Benedito, J. G. B Carvalho, J. S. Cruz, J. G. S Maia, Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents, *Journal of Ethnopharmacology* 124 (2009), 440 – 443.

[5] A.C. Altamura, B. Dell’Osso, M. Serati, M. Ciabatti, M. Buoli, Recent assessments on the neurobiology of major depression: a critical review, *Rivista di Psichiatria* 43 (2008), 185 – 207.

[6] M. Berk, F. Ng, O. Dean, S. Dodd, A.I. Bush, Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacology Sciences* 29 (2008), 346 – 351.

[7] M. Bilici, H. Efe, M.A. Koroglu, H.A. Uydu, M. Bekaroglu, O. Deger, Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments, *Journal of Affective Disorders* 64 (2001), 43 – 51.

[8] X. Cao, Z. Liu, C. Xu, Disrupted resting-state functional connectivity of the hippocampus in medication-naïve patients with major depressive disorder, *Journal of Affective Disorders* 2012. 507Q31 [Mar 27 Epub ahead of print].

[9] E.A. Carlini, Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75 (2003), 501– 512.

[10] P. Celada, M. Puig, M. Amargos-Bosch, A. Adell, F. Artigas, The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression, *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 29 (2004), 252 – 265.

[11] C.W. Choi, S.C. Kim, S.S. Hwang, B.K. Choi, H.J. Ahn, M.Y. Lee, S.H. Park, S.K. Kim, Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, *Plant Science* 153 (2002), 1161 – 1168.

[12] A.R.S. Colla, D.G. Machado, L.E.B. Bettio, G. Colla, M.D.A. Magina, I.M.C. Brighente, A.L.S. Rodrigues, Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice, *Journal of Ethnopharmacology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.038>.

[13] J.F. Cryan, C.Mombereau, A. Vassout, The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 (2005), 571– 625.

[14] A.S. Elhwuegi, Central monoamines and their role in major depression, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28 (2004), 435 – 451.

[15] I. Eren, M. Naziroglu, A. Demirdas, Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochemical Research* 32 (2007), 1188 – 1195.

[16] A. Frazer, Norepinephrine involvement in antidepressant action. *Journal of Clinical Psychiatry* 1 (2000), 25 – 30.

[17] P.B. Gomes, E.C. Noronha, C.T. Melo, Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice, *Journal of Ethnopharmacology* 120 (2008), 209 – 214.

[18] B. Halliwell, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97 (2006), 1634 – 1658.

[19] K. Ishihara, M. Sasa, Potentiation of 5-HT₃ receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments, *Neuroscience Letters* 307 (2001), 37 – 40.

[20] M. Maes, N. De Vos, R. Pioli, P. Demedts, A. Wauters, H. Neels, Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness, *Journal of Affective Disorders* 58 (2000) 241 – 246.

[21] H. Ohkawa, H. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry* 95 (1979), 351–358.

[22] M. Paez-Pereda, New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants, *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 29 (2005), 1010 – 1016.

[23] P. Rauhala, A. Khaldi, K.P. Mohanakumar, C.C. Chiueh, Apparent role of hydroxyl radicals on oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside, *Free Radicals and Biology Medicine* 24 (1998), 1065 – 1073.

[24] O.J. Robinson, R. Cools, C.O. Carlisi, B.J. Sahakian, W.C. Drevets, Ventral striatum response during reward and punishment reversal learning in unmedicated major depressive disorder, *American Journal of Psychiatry* 169 (2012), 152 – 159.

[25] G.H. Seol, H. S. Shim, P.J. Kim, H.K. Moon, K.H. Li, I. Shim, S.H. Suh, S.S. Min, Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats, *Journal of Ethnopharmacology* 130 (2010), 187 – 190.

[26] L. Steru, R. Chermat, B. Thierry, P. Simon, The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 85 (1985), 367– 370.

[27] S. Tsutsumi, K. Tsuji, K. Ogawa, T. Ito, T. Satake, Effect of dietary salt and cholesterol loading on vascular adrenergic receptors. *Blood Vessels* 25 (1988), 209 – 216.

[28] F. N. Victoria, E. J. Lenardão, L. Savegnago, G. Perin, R. J. Guimarães, A. S. Motta, W. P. Silva, P. S. Nascente, Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties, *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012), 2668 – 2674.

[29] R.N. Walsh, R.A. Cummins, The Open-Field Test: a critical review, Psychological Bulletin 83 (1976), 482– 504.

[30] P. Weyerstahl, H. Marschall-Weyerstahl, C. Christiansen, B. O. Oguntimein, A. O. Adeoye, Volatile constituents of Eugenia uniflora leaf oil, Planta Medica 54 (1988), 546 – 554.

[31] WHO, Depression. World Health Organisation, Geneva (2006), www.who.int/mental/management/depression/definision/en/print.html.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A análise da composição química do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* revelou compostos sesquiterpenos, oxigenados e não oxigenados, como os compostos majoritários. Os compostos identificados foram: óxido de selina-1,3,7-trien-8-ona, selina-1,3,7-trien-8-ona, germacreno A, germacreno B, germacreno D, curzereno, β -cariofileno. Vários trabalhos estudaram a composição química do OE das folhas de *E. uniflora*, e os compostos encontrados como majoritários foram selina-1,3,7-trien-8-ona e o seu óxido e curzereno (WEYERSTAHL et al., 1988; COSTA et al., 2011), compostos estes encontrados no OE utilizado neste trabalho. As variações na composição química e na concentração dos compostos em óleos essenciais são decorrentes de diferenças da origem geográfica, sazonalidade, quimiotipos e diferentes métodos de extração.

O óleo essencial das folhas de *E. uniflora* apresentou atividade antioxidante através da capacidade sequestrante de radicais livres sintéticos, como DPPH e ABTS e capacidade redutora do íon férrico. O valor de IC_{50} (concentração que inibe 50% dos radicais presentes) de um composto está relacionado com a potência do composto no experimento, este valor foi de 8,33 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio ABTS e 833,3 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio DPPH. A neutralização de radicais ABTS está relacionada com a transferência de elétrons da molécula antioxidante para o radical ABTS (RE et al., 1999) (Figura 12 A), enquanto a capacidade sequestrante de radicais DPPH está relacionada com a transferência de elétrons e prótons ao radical (CHEN et al., 1995) (Figura 12 B), sendo assim é possível inferir que a atividade sequestrante de radicais livres do OE está relacionado com a transferência de elétrons. Estes dados foram confirmados pela capacidade do OE de reduzir o íon férrico (Fe^{+++}) (Figura 12 C), confirmando o envolvimento da transferência de elétrons no mecanismo antioxidante do OE.

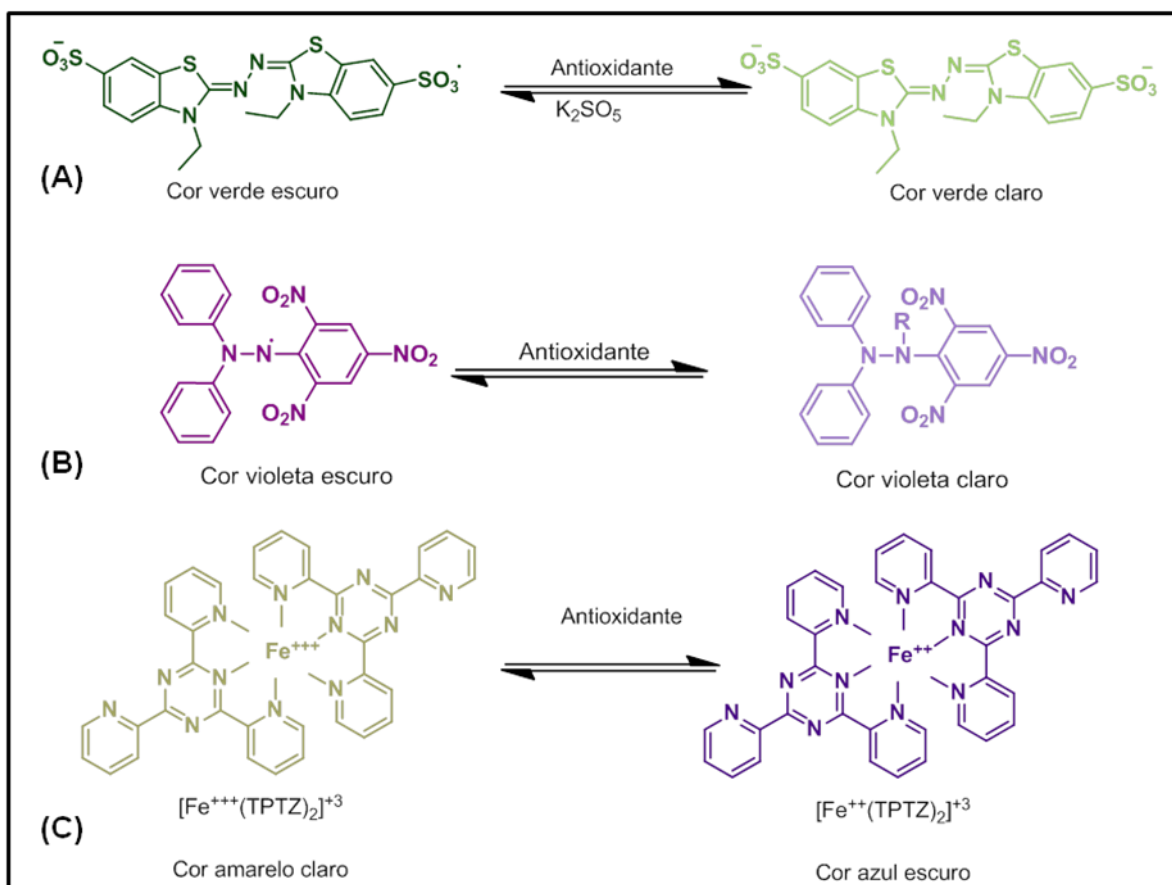


Figura 12: (A) – Neutralização do radical ABTS, (B) – Neutralização do radical DPPH, (C) – Redução do íon férrico.

Para estender os estudos sobre o potencial farmacológico do OE, a toxicidade aguda do OE foi avaliada em camundongos. A partir dos resultados obtidos é possível sugerir que o OE das folhas de *E. uniflora* possui uma dose letal para 50% dos animais (DL_{50}) superior a 200 mg/kg. Os parâmetros bioquímicos determinados confirmam a ausência de toxicidade das doses utilizadas, como os níveis de peroxidação lipídica, a atividade das enzimas δ -Ala D e catalase e os níveis de ácido ascórbico. Um resultante interessante obtido foi a redução da peroxidação lipídica basal no rim dos camundongos tratados com o OE, demonstrando o efeito antioxidante do OE.

Além disso, o OE apresentou efeito antibacteriano contra cepas de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, duas bactérias causadoras de intoxicações e infecções alimentares e fungos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporum*. A preocupação com relação a bactérias e fungos patogênicos vem crescendo devido ao aumento de surtos infecções

bacterianas e fúngicas. Devido a esse aumento e ao aumento do número de micro-organismos resistentes aos antibióticos existe um considerável interesse na investigação dos efeitos antimicrobianos de óleos essenciais e de diferentes extratos, contra uma gama de micro-organismos, para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos naturais, para a preservação de alimentos e controle de infecções. Assim, os óleos essenciais, como o OE das folhas de *E. uniflora*, são agentes antimicrobianos naturais com aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica, para o controle de fungos e bactérias patogênicos (RAHMAN & KANG; 2009).

Devido à característica lipofílica dos OEs estes podem promover a permeabilização das membranas celulares em bactérias, a qual está associada às perdas de íons, redução do potencial de membrana, colapso da bomba de prótons e diminuição dos níveis de ATP (DI PASQUA et al., 2006, KNOBLOSCH et al., 1989, TURINA et al, 2006). Em células eucarióticas, os óleos essenciais podem promover despolarização das membranas mitocondriais através da redução do potencial de membrana, afetando os canais de cálcio (NOVGORODOV; GUDZ, 1996, RICHTER; SCHLEGEL, 1993) e outros canais iônicos e também reduzem o gradiente de pH, afetando dessa maneira a bomba de prótons e a produção de ATP (BAKKALI et al., 2008).

Em outro estudo o OE apresentou propriedades de reverter um dano hepático induzido por uma superdose de acetoaminofeno (ou paracetamol), através da restauração de parâmetros bioquímicos, como os níveis de peroxidação lipídica, atividades das enzimas δ -Ala-D, AST e ALT, GST e os níveis de NPSH.

A hepatotoxicidade do acetoaminofeno ocorre devido à sua metabolização, em doses normais o acetoaminofeno é metabolizado por conjugação e sulfatação (FORREST et al., 1982), o principal metabólito é o NAPBQI (N-acetil-p-benzoquinona-imina). Porém, doses excessivas deste medicamento levam à saturação do processo metabólico pelas vias do ácido glicurônico e pela sulfatação, sobrecarregando o sistema do citocromo e aumentando a produção deste metabólito tóxico (MAKIN & WILLIAMS, 1994). O NAPBQI é uma espécie reativa que se condensa rapidamente com a glutathione, porém as reservas de glutathione são limitadas, sendo depletadas na

tentativa de detoxificar os metabólitos, a redução dos níveis contribui para o estresse oxidativo celular.

Muitos estudos demonstram a ação de diferentes antioxidantes em modelos animais de intoxicação por acetoaminofeno, estes autores demonstraram que diferentes extratos de plantas (KUPELI et al., 2006; YEN et al., 2007) são capazes de reduzir alterações bioquímicas e histológicas causadas pela acetoaminofeno. Dessa maneira, é possível que o efeito do OE na reversão dos parâmetros bioquímicos alterados pela intoxicação com paracetamol esteja relacionado com a capacidade antioxidante do OE, já demonstrada anteriormente. Esta hipótese foi reforçada pela capacidade do OE das folhas de *E. Uniflora* em reduzir os níveis de peroxidação lipídica basal no fígado de camundongos. Além disso, o OE não apresentou toxicidade ao DNA, a qual foi avaliada através dos ensaios cometa em sangue periférico e medula óssea de camundongos e DNA nicked.

Várias evidências indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido em diversas patologias como, por exemplo, na depressão. No entanto, até então não existem evidências concretas que afirmem se o estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento da depressão, ou se é uma consequência desta patologia (BILICI et al., 2001). O OE das folhas de *E. uniflora* apresentou efeito tipo-antidepressivo no teste preditivo de suspensão da cauda (TSC), este consiste em suspender o animal pela cauda e avaliar o tempo que o animal permanece imóvel durante um intervalo de tempo fixo (Steru et al., 1985). Além disso, através de estudos sobre o envolvimento dos sistemas serotoninérgicos e adrenérgicos é possível inferir que estes sistemas estão envolvidos no efeito do tipo antidepressivo do OE das folhas de *E. uniflora*, pois a utilização de antagonistas de receptores adrenérgicos (α_1 e α_2) e serotoninérgicos (5-HT_{2A}) bloquearam o efeito do OE. Neste mesmo trabalho estudos sobre o efeito antioxidante do OE foram complementados, através de ensaios de peroxidação lipídica, estes demonstraram que o OE reduz os níveis de peroxidação lipídica em estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e cerebelo) estruturas relacionadas com os processos depressivos (SEOL et al., 2010).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. apresentou:

- Efeito antioxidante frente a radicais livres sintéticos, potencial redutor do íon férrico, efeito antibacteriano e antifúngico.
- Efeito hepatoprotetor na dose de 200 mg/kg restaurando parâmetros oxidativos no fígado de camundongos modificados pela injúria induzida por paracetamol.
- A administração oral do óleo essencial de pitanga não demonstrou toxicidade ao DNA, através dos ensaios cometa em sangue periférico e medula óssea de camundongos e do teste *in vitro* DNA nicked, que utilizava o plasmídeo como modelo de estudo.
- Efeito antidepressivo no teste de suspensão da cauda, através do envolvimento com receptores 5-HT_{2A/2C}, α_1 e α_2 adrenérgicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUHAMDAH S., CHAZOT P.L. Lemon balm and lavender herbal essential oils: Old and new ways to treat emotional disorders? **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 19, p. 221 – 226, 2008

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Molecular Biology of the cell**. 3 edição. New York & London: Garland Publish, 1994.

ALEXANDER P. Can antioxidant facilitate cancer induction? Oxidation reactions involved in host-mediated destruction of cancer cells. In Nygaard OF, Simic MG (ed): **Radioprotectors and anticarcinogens**. New York: Academic Press, 575-584.1983.

ALEXI, T., HUGHES, P. E., FAULL, R. L. M., WILLIAMS, C. E. 3-Nitroporponic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. **Neuroreport**, v. 9, p. r 57 – r 64, 1998.

ALLAHVERDIYEVA, A., DURANB, N., OZGUVENC, M., KOLTAS, S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. **Phytomedicine**, v. 11, p-. 657 – 661, 2004.

Almeida, R. N., Navarro, D. S. Barbosa-Filho, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310 – 322, 2001.

ALONSO-MORAGA, A.; BOCANEGRA, A.; TORRES, J. M.; LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Glutathione status and sensitivity to GSH-reacting compounds of *Escherichia coli* strains deficient in glutathione metabolism and/or catalase activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 73, p. 61 – 68, 1987.

AMORIM, A. C. L., LIMA, C. K. F., HOVELL, A. M. C., MIRANDA, A. L. P., REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, p. 923 – 928, 2009.

ANDERSON, I. M. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats. **Journal of Affective Disorders**, v. 58, p. 19 – 36, 2000.

ARAI, I., AMAGAYA, S., KOMATSU, Y., OKADA, M., HAYASHI, T., KASAI, M., ARISAWA, M., MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 307 – 314, 1999.

ASONGALEM, E. A., FOYET, H. S., NGOGANG, J., FOLEFOG, G. N., DIMO, T., KAMTCHOUING, P. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 301 – 308, 2004.

ASTANI, A. REICHLING, J., SCHNITZLER, P. Antiviral Activity of Monoterpene Components of Essential Oils Against Herpes Simplex Virus. **Antiviral Research**, v. 82, p. A1 – A83, 2008.

AURICCHIO, M. T., BACCHI, E. Folha de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, p. 55 – 61, 2003.

ÁVILA-PEÑA, D., PEÑA, N., QUINTERO, L., SUÁREZ-ROCA, H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 380 – 385, 2007.

BABIOR, B. M. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. The New England Journal of Medicine, v. 298, p.721 – 25, 1978.

BAGETTI, M., FACCO, E. M. P., PICCOLO, J., HIRSCH, G. E., RODRIGUEZ-AMAYA, D., KOBORI, C. N., VIZZOTTO, M., EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 147 – 154, 2011.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446 – 475, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, p. 113 – 123, 2006.

BARTSCH, H.; NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. **Cancer Detection and Prevention Journal**, v. 28, p. 385 – 391, 2004.

BEIRITH, A., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219 – 228, 2002

BERK, M., COPOLOV, D. L., DEAN, O., LU, K., JEAVONS, SCHAPKAITZ, I. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder—a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Biological Psychiatry**, v. 64, p. 468 – 475, 2008.

BERLETT, B. S., STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 20313 – 10316, 1997.

BERTON, O., NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 7, p. 137 – 151, 2006.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610 – 1615, 1999.

BETTS, T. J. Chemical characterization of the different types of volatile oils constituents by various solutes retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 33 – 46, 2001.

BEZERRA, J. E. F., SILVA JUNIOR, J. F., LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

Bounatirou S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M. M., Costa, M. M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, v. 105, p. 146 – 155, 2007.

BURT, S. Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223 – 253, 2004.

BYERS, M. R., BONICA, J. J. **Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity**. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC (Eds). *Bonica's Management of Pain*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, p 26–72, 2001.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, v. 6, p. 391 – 397, 1997.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medica**, v. 3, p. 1 – 5, 2006.

CALIXTO, J. B., CABRINI, D. A., FERREIRA, J., CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, v. 87, p. 1 – 5, 2000.

CARSON, C. F., MEE, B. J., RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, v. 46, p. 1914 – 1920, 2002.

CHEN, W., KOENIGS, L. L., THOMPSON, S. J., PETER, R. M., RETTIE, A. E., TRAGER, W. F., NELSON, S.D. Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and non toxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chemical Research in Toxicology*, v. 11, p. 295 – 301, 1988.

CHUNG, S. H.; CHUNG, S. M.; LEE, J. Y.; KIM, S. R.; PARK, K. S.; CHUNG, J. H. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. **FEBS Letters**, v. 449, p. 235 – 240, 1999.

CONSOLINI, A. E., SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat' heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 57 – 63, 2002.

CONSOLINI, A.E., BALDINI, O.A.N., AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 33 – 39, 1999.

COSTA, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C., PASSOS, X. S., SILVA, M. R. R., SERAPHIN, J. C., FERRI, P. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 851 – 858, 2010.

COSTA, V., MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: **insights into ageing, apoptosis and diseases**. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217 – 246, 2001.

COUTINHO, H. D. M., COSTA, J. G. M., FALCÃO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P., LIMA, E. O. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**, v. 41, p. 67 – 72, 2012.

CRISP, T., MINUS, T. O., COLEMAN, M. L., GILES, J. R., CIBULA, C., FINNERTY, E. P. Aging, peripheral nerve injury and nociception: effects of the antioxidant 16-desmethylnitrazepam. **Behaviour Brain Research**, v. 166, p. 159 – 165, 2006.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRISSELMAN, W.; JONES, R.J. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: Courier Companies, p.1250 – 1318, 2000.

DEON, M., WAJNER, M., SIRTORI, L. R., FITARELLI, D., COELHO, D. M., SITTA, A., BARSCHAK, A. G., FERREIRA, G. C., HAESER, A., GIUGLIANI, R., VARGAS, C. R. The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Journal of Neurological Science*, v. 247, p. 157 – 164, 2006.

DOUGLAS, K. T. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 59, p. 103- 167, 1987.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47 – 95, 2002.

DUNN, A. J., SWIERGIEL, A. H., BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neuroscience & Biobehaviour Reviews**, v. 29, p. 891 – 909, 2005.

EBERHARDT, M. V. Antioxidant activity of various apple cultivars. **Journal of American Chemical Society**, v. 221, p. 118 – 122, 2001.

Elaissi, A., Salah, A. H., Mabrouk, S., Larbi, K. M., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1427 – 1434, 2011.

EREN, I., NAZIROGLU, M., DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochemical Research*, v. 32, p. 1188 – 1195, 2007.

FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 9, p. 3 – 7, 2001.

FERNANDES, E. S., PASSOS, G. F., MEDEIROS, R., CUNHA, F. M., FERREIRA, J., CAMPOS, M. M., PIANOWSKI, L. F., CALIXTO, J. B. Anti inflammatory effects of compounds alpha- humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228 – 236, 2007

FIUZA, T. S. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, p. 21 – 31, 2008.

FORREST, J. A., CLEMENTS, J. A., PRESCOTT, L. F. Clinical pharmacokinetics of paracetamol. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 7, p. 93 – 107, 1982.

FRIDOVICH, I. Superoxide Anion Radical ($O_2^{\cdot-}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 18515 – 18517, 1997.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, v. 48, p. 129 – 141, 1999.

GABILONDO, A. M., MEANA, J. J., GARCÍA-SEVILLA, J. A. Increased density of μ -opioid receptors in postmortem brain of suicide victims. **Brain Research**, v. 682, p. 245 – 250, 1999.

GAGLIESE L, MELZACK R. Chronic pain in elderly people. **Pain**, v. 70, p. 3 – 14, 1997.

GALEOTTI, N., BARTOLINI, A., GHELARDINI, C. Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Neuropharmacology**, v. 50, p. 309 – 316, 2006.

GALI-MUHTASIB, H. Anticancer and medicinal properties of essential oil and extracts of East Mediterranean sage (*salvia triloba*). *Lead Molecules from Natural Products*, M.T.H. Khan and A. Ather (eds.), 2006.

GANESAN, S., KARR, J. E., FEATHERSTONE, D. E. *Drosophila* glutamate receptor mRNA expression and mRNP particles. **RNA Biology**, v. 8, p. 771 – 781, 2011.

GARG, R., RAMCHANDANI, A.G., MARU, G.B. Curcumin decreases 12-Otetradecanoylphorbol-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1249 – 1257, 2008.

GAUDIANO, B. A., YOUNG, D., CHELMINSKI, I., ZIMMERMAN, M. Depressive symptom profiles and severity patterns in outpatients with psychotic vs nonpsychotic major depression. **Comprehensive Psychiatry**, v. 49, p. 421–429, 2008.

GIANNI, P., JAN, K. J., DOUGLAS, M. J., STUART, P. M., TARNOPLISKY, M. A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 1391 – 1400, 2004.

GIBSON, J. D., PUMFORD, N. R., SAMOKYSZYN, V. M., HINSON, J. A. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 580 – 585, 1996.

GOBBI, M., VALLE, F. D., CIAPPARELLI, C., DIOMEDE, L., MORAZZONI, P., VEROTTA, L., CACCIA, S., CERVO, L., MENNINI, T. *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 360, p. 262 – 269, 1999.

GOMES, R. P. A pitangueira. **Fruticultura brasileira**. 13a Ed. São Paulo: Nobel, p. 384 – 388, 2007.

GRAF, E., MAHONEY, J.R., BRYANT, R.G., EATON, J.W., Iron catalyzed hydroxyl radical formation: stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 3620 – 3624, 1984.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives in Toxicology**, v. 86, p. 345 – 391, 2012.

GUSTAFSON, J. E., LIEW, Y. C., CHEW, S., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., WYLLIE, S. G., WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 194 – 198, 1998

HABER, F.; WEISS, J. On the catalysis of hidroperoxide. **Naturwissenschaften**, v. 20, p. 948 – 950, 1932.

HAJASHEMI, V., ZOLFAGHARI, B., YOUSEFI, A. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of *Satureja hortensis* Seed Essential Oil, Hydroalcoholic and Polyphenolic Extracts in Animal Models. **Medical Principles and Practice**, v. 21, p. 178 – 182, 2012.

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development. Is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 32, p. 968 – 974, 2002.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634 – 1658, 2006 a.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? Trends Biochem. **Science**, v. 31, p. 509 – 515, 2006c.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312 – 322, 2006b.

HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford, UK: Oxford University Press, 2003.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4. ed. Clarendon Press, Oxford, 2006 a.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 Ed. Oxford University Press, London, 1999.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters**, v. 281, p. 9 – 19, 1991.

HARDMAN, J. G., GOODMAN, G. A., LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman's: The pharmacological basic of therapeutics. 9 ed. New York, McGraw-Hill, 2004.

HARMAN, A. W., KYLE, M. E., SERRONI, A., FARBER, J. L. The killing of culture hepatocytes by N-acteyl-p-benzoquinone imine, (NAPQI) as a model pf cytotoxicity of acetaminophen. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 1111 – 1117, 1991.

HENRIQUES, A. T., SOBRAL, M. E., CAUDURO, A. D., SCHAPOVAL, E. E., BASSANI, V. L., LAMATY, G., MENUT, C., BESSIERE, J. M., Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, p. 501 – 505, 1993.

HERKEN, H., GUREL, A., SELEK, S., ARMUTCU, F., OZEN, M.E., BULUT, M., KAP, O., YUMRU, M., SAVAS, H.A., AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Archives of Medical Research**, v. 38, p. 247 - 252, 2007.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027 – 1031, 2002.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p. 103 – 114, 1987.

JAESCHKE, H., BAJT, M. L. Intracellular signaling mechanism of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicology Science*, v. 89, p. 31 – 41, 2006.

JAESCHKE, H., KNIGHT, T. R., BAJT, M. L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 144, p. 279 – 288, 2003.

JESSE, C. R., SAVEGNAGO, L., NOGUEIRA, C. W. Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis selenide in mice. **Brain Research**, v. 1231, 25 – 33, 2008.

JONES, W. P., CHIN, Y. W., KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 247 – 264, 2006.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997.

KADE, I. J., IBUKUN, E. O., NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. T. Sun-drying diminishes the antioxidant potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in

homogenates of rat brain and liver. **Experimental Toxicology and Pathology**, v.60, p. 365 – 371, 2008

KHALIL, Z., KHODR, B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p. 430 – 439, 2001.

KHALIL, Z., LIU, T., HELME, R. D. Free radical contribute to the reduction in peripheral vascular response and the maintenance of thermal hiperalgesia in rats with chronic constriction injury. **Pain**, v.79, p. 31 – 37, 1999.

KIM, H. K., KIM, J. H., GAO, X., ZHOU, J. L., LEE, I., CHUNG, K., CHUNG, J. M. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. **Pain**, v. 122, p. 53 – 62, 2006.

KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, B., WEIGAND, H., WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119 – 128, 1989.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A; VALENTE, C. M. L. Citocinas Próinflamatórias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199 – 206, 2006

KULKARNI, S.K., DHIR, A. Current investigational drugs for major depression. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, p. 767 – 788, 2009.

KUPELI, E.; ORHAN, D.D.; YESILADA, E. Effect of *Cystus laurifolius* leaf extract and flavonoids on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 455 – 460, 2006.

LAGO, J. H. G., SOUZA, E. D., MARIANE, B., PASCON, R., VALLIN, M. A., MARTINS, R. C. C., BAROLI, A., CARVALHO, B. A., SOARES, M. G., SANTOS, R. T., SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae-Eugenia uniflora L. and Plinia trunciflora (O. Berg) Kauser. **Molecules**, v. 16, p. 9827 – 9837, 2011

LAZARINI, C. A., UERNA A. H., BRANDAO, G. M. S., CUI MARAES, A. P. C., BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. **Phytomedicine**, v. 76, p. 477 – 481, 2000.

LEE, J.; GODON, C.; LAGNIEL, G.; SPECTOR, D.; GARIN, J.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 16040 – 16046, 1999.

LEE, Y.; LEE, C. H.; HO, U. Painful channels in sensory neurons. **Molecular and Cells**. v. 20, p. 315 – 324, 2005.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346 – 357, 1994.

Lima, G. L., Quintans-Júnior, J. L., Thomazzi, S. M., Almeida, E. M. S. A, Melo, M. S., Serafini, M. R., Cavalcanti, S. C. H., Gelain, D. P., Santos, J. P., Blank, A. F., Alves, P. B., Neta, P. O., Lima, J. T., Rocha, R. F., Moreira, J. C. F., Araújo, A. A. S. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Chrysopogon zizanioides* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, p. 443 – 450, 2012.

LIMA, I. M., SOUZA, R. M., SILVA, C. P., CARNEIRO, R. M. D. G. *Meloidogyne* spp. from preserved areas of Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 31 – 38, 2005.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenoides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447 – 450, 2002.

LINDE, K., KNUPPEL, L. Large-scale observational studies of hypericum extracts in patients with depressive disorders – a systematic review. **Phytomedicine**, v. 12, p. 148 – 157, 2005.

LOESER, J.D., MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607 – 1609, 1999.

LOGUERCIO, C. FREDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical and Biology Medicine*, v. 34, p. 1 – 10, 2003.

LOPES, A. S. **Pitanga e acerola: Estudo de processamento, estabilidade e formulação de néctar misto**. 193 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LOTSCH, J., GEISSLINGER, G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, p. 485 – 499, 2001.

MA, W.; QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? **Neuroscience Letters**, v. 437, p. 165–169, 2008.

MAES, M., DE VOS, N., PIOLI, R., DEMEDTS, P., WAUTERS, A., NEELS, H. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **Journal of Affective Disorders**, v. 58, p. 241 – 246, 2000.

MAKIN, A., WILLIAMS, R. The current management of paracetamol overdose. The **British Journal of Clinical Practice**, v. 48, p. 144 – 148, 1994.

MALMBERG, K. J., ARULAMPALAM, V., ICHIHARA, F., PETERSSON, M., SEKI, K., ANDERSSON, T., LENKEI, R., MASUCCI, G., PETTERSSON, S., KIESSLING, R. Inhibition of activated/ memory (CD45RO+) T cells by oxidative stress associated with block of NF-Kb activation. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 2595 – 2601, 2001.

MANDELKER, I. Introduction to oxidative stress and mitochondrial disfunction. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 38, p. 1 – 30, 2008.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 361 – 370, 2000.

MARTINDALE, J., BLAND-WARD, P. A., CHESSELL, I. P. Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin. **Neuroscience Letters**, v. 316, p. 33 – 36, 2001.

MELO, R. M., CORRÊA, V. F. S., AMORIM, A. C. L., MIRANDA, A. L. P., REZENDE, C. M. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.18, p. 179 – 183, 2007.

MIGUEL, G., SIMÕES, M., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G., CARVALHO, L. Composition and antioxidant activities of the

essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. **Food Chemistry**, v. 86, p. 183 – 188, 2004.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1 – 164, 1999.

MITCHELL, J. R., JOLLOW, D. J., POTTER, W. Z., DAVIS, D. C., GILLETTE, J. R., BRODIE, B. B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I Role of drug metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 187, p. 185 – 194, 1973.

MONTGOMERY, S.A. Why do we need new and better antidepressants? **International Clinical Psychopharmacology**, (Suppl. 1), S1 – S10, 2006.

MORRISSEY, P.A., AND O'BRIEN, N. M. Dietary antioxidants in health and disease. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 463 – 472, 1998.

NAIK, A. K., TANDAN, S. K. DUDHGAONKAR, S. P., JADHAV, S. H., KATARIA, M., PRAKASH, V. R., KUMAR, D. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. **European Journal of Pain**, v.10, p. 573 – 579, 2006.

NAKAGAWA, Y., ISHIMA, T., ISHIBASHI, Y., YOSHII, T., TAKASHIMA, T. Involvement of GABA(B) receptor systems in action of antidepressants: baclofen but not bicuculline attenuates the effects of antidepressants on the forced swimming test in rats. **Brain Research**, v. 709, p. 215 – 220, 1996.

NELSON, D. L., COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 5 ed., Porto Alegre, ARTMED, 2011.

NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

NOVAK, J. C., LOVELL, J. A., STUESSE, S. L., CRUCE, W. L., McBURNEY, D. L., CRISP, T. Aging and neuropathic pain. **Brain Research**, v. 833, p. 308 – 310, 1999.

NOVGORODOV, S.A., GUDZ, T.I. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. **Journal of Bioenergy and Biomembranes**, v. 28, p. 139 – 146, 1996.

OGUNWANDE, I. A., OLAWORE, N. O., EKUNDAYO, O., WALKER, T. M., SCHMIDT, J. M., SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147 – 152, 2005.

OJEWOLE, J. A., AMABEOKU, G. J. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 696 – 700, 2006.

OSTHOFF, K. S.; BAUER, M. K. A.; VOGT, M.; WESSELBORG, S. Oxidative stress and signal transduction. **International Journal of Nutritional Research**, v. 67, p.336 – 342, 1997.

PAVIN, N. P., DONATO, F., CIBIN, F. W., JESSE, C. R., SCHNEIDER, P. H., SALLES, H. D., SOARES, L. A., ALVES, D., SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and anti-hypernociceptive effects of Se-phenyl thiazolidine-4-carboselenoate in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 169 – 176, 2011.

PERERA, T. D., COPLAN, J. D., LISANBY, S. H., LIPIRA, C. M., ARIF, M., CARPIO, C., SPITZER, G., SANTARELLI, L., SCHRIF, B. HEN, .R., ROSOKLIJA, G., SACKEIM, H. A., DWORK, A. J. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 4894 – 4901, 2007.

PERRY N, PERRY E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders: clinical and neuropharmacological perspectives. **CNS Drugs**, v. 20, p. 257 – 280, 2006.

PETRIE, R. X. A., EID, I. C., STEWART, C. A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic, plasticity, and depressive disorder. A critical review. **Clinical Pharmacology Therapy**, v. 87, p. 11 – 25, 2000.

PINHO, J. P. M., SILVA, A. S. B., PINHEIRO, B. G., SOMBRA, I., BAYMA, J. C., LAHLOU, S., SOUZA, P. J. C., MAGALHAES, P. J. C. Antinociceptive and Antispasmodic Effects of the Essential Oil of *Ocimum micranthum*: Potential Anti-inflammatory Properties. **Planta Medica**, v. 78, p. 681 – 685, 2012.

PITTENGER, C., DUMAN, R. S. Stress, depression and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 88 – 109, 2008.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*, v. 25, p. 290 – 314, 1983.

PUMFORD, N. R., HINSON, J. A., POTTER, D. W., ROWLAND, K. L., BENSON, R. W., ROBERTS, D. W. Immunochemical quantitation of 3-(cystein-S-yl)acetaminophen adducts in serum and liver proteins of acetaminophen-treated mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, p. 190 – 196, 1989.

RAHMAN, I.; YANG, S. R.; BISWAS, S. K. Current concepts of redox signaling in the lungs. *Antioxidants and Redox Signaling*, v.8, p. 681–689, 2006.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REZNICK, A. Z., PACKER, L. **Free radicals and antioxidants in muscular and neurological diseases and disorders**. In: PILO, G., ALBANO, E., DIANZANI, M. U. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Birkhäuser: Basel, 1993.

RICHTER, C., SCHLEGEL, J. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. **Toxicology Letters**, v. 67, p. 119 – 127, 1993

RIMM, E. B., ASCHERIO, A., GIOVANNUCCI, E., SPIEGELMAN, D., STAMPFER, M. J., WILLETT, W. C. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. **JAMA**, v. 275, p. 447 – 451, 1996.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 94 – 105, 2007.

SAH, S. P., MATHELA, C. S., CHOPRA, K. Antidepressant effect of *Valeriana wallichii* patchouli alcohol chemotype in mice: behavior and biochemical evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p. 197 – 200, 2011.

SAHA, S. P., MATHELAB, C. S., CHOPRAC, K. Involvement of nitric oxide (NO) signalling pathway in the antidepressant activity of essential oil of *Valeriana wallichii* Patchouli alcohol chemotype. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1269 – 1275, 2011.

SANTOS, K. K. A., MATIAS, E. F. F., TINTINO, S. R., SOUZA, C. E. S., BRAGA, M. F. B. M., GUEDES, G. M. M., ROLÓN, M., VEJA, C., ARIAS, A. R., COSTA, J. G. M., MENEZES, I. R. A., COUTINHO, H. D. M. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130 – 132, 2012.

SARANDOL, A., SARANDOL, E., EKER, S. S., ERDIN, S., VATANSEVER, E., KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 22, p. 67 – 73, 2007.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995 – 1014, 2005.

SCHAPOVAL, E. E. S., SILVEIRA, S. M., MIRANDA, M. L., ALICE, C. B., HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 137 – 142, 1994.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 509 – 522, 1965.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., THEODULOZ, C., FRANCO, L., FERRO, E. B., ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 183 – 186, 1987.

SCHNITZLER, P., SCHUHMACHER, A., ASTANIA, A., REICHLING, J., *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpes viruses. **Phytomedicine**, v. 15, p. 734 – 740, 2008.

SEOL, G. H., SHIM, H. S., KIM, P. J., MOON, H. K., LEE, K. H., SHIM, I., SUH, S. K., MIN, S. S. Antidepressant-like effects of *Salvia sclarea* is explained

by modulation of dopamine in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 187 – 190, 2010.

SERAFIN, C., NART, V., MALHEIROS, A., CRUZ, A. B., MONACHE, F. D., GETTE, M. A., ZACCHINO, S., CECHINEL FILHO, V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 578 – 582, 2007.

SHU, Y.Z., Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053 – 1071, 1998.

SIES, H. **Oxidative Stress**: Oxidants and Antioxidants. Academic Press, New York, 1991.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, p. 287 – 290, 1979.

SINGH, H. P., MITTAL, A. S., KAUR B. S., BATISH, B. R., KOHLI, R. K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 642 – 645, 2009.

SIRTORI, L. R., DUTRA-FILHO, C. S., FITARELLI, D., SITTA, A., HAESER, A., BARSCHAK, A. G., WAJNER, M., COELHO, D. M., LLESUY, S., BELLO-KLEIN, A., GIUGLIANI, R., DEON, M., VARGAS, C. R. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1740, p. 68 – 73, 2005.

SOUZA, A. E. F. **Dermatofitose associadas a fungos do gênero Microsporum**. Clínica Veterinária, São Paulo/SP, v. 13, p. 24-26, 2002.

SRINIVASAN, C.; LIBA, A.; IMLAY, J.A.; VALENTINE, J.S.; GRALLA, E. B. Yeast lacking superoxide dismutase shows elevated levels of free iron as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 29187 – 29192, 2000.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging, **Science**, v. 257, p. 1220 – 1224, 1992.

STEIN, C., SCHÄFER, M., MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**, v. 9, p. 1003 – 1008, 2003.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Research**, v.2, p. 379 – 385, 2005.

SYLVESTRE, A. M., PICHETTE, A. A., LONGTIN A. A., NAGAUB, F., LEGAULT. J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99 – 102, 2006.

TAVARES, A. C., GONÇALVES, M. J., CAVALEIRO, C., CRUZ, M. T., LOPES, M. C., CANHOTO. J., SALGUEIRO, L. R. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 129 – 134, 2008.

TEPE, B., SIHOGLU-TEPE, A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 103, p. 766 – 770, 2007.

THEODULOZ, C., FRANCO, L., FERRO, E. B., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 179 – 183, 1988.

TIAN, J., BAN, X., ZENG, H., HE, J., HUANG, B., WANG, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 464 – 470, 2011.

TIMBRELL, J. Principles of biochemical toxicology. 3 ed., Londres: Taylor & Francis, 2000.

TJOLSEN, A., BERGE, O. G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5 – 17, 1992.

TRABER, M. G., FREI, B., BECKMAN, J. S. Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention? **Current Opinion in Lipidology**, v.19, p. 30 – 38, 2008.

TSUBOI, H., TATSUMI, A., YAMAMOTO, K., KOBAYASHI, F., SHIMOI, K., KINAE, N. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **Journal of Affective Disorders**, v. 91, p. 63 – 70, 2006.

TUBARO, A., DRI, P., DELBELLO, G., ZILLI, C., DELLALOGGIA, R..
The croton oil ear test revisited. **Agents Actions**, v.17, 347 – 349, 1985.

TUGGLE, C. K.; FUCHS, J. A. Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in Escherichia coli K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p. 448 – 450, 1986.

TURINA, A. V., NOLAN, M. V., ZYGADLO, J. A., PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101 – 113, 2006.

ULTEE, A., BENNIK, M.H., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561 – 1568, 2002.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44 – 84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p.1 – 40, 2006.

VAN DER VEEN, R. C., DIETLIN, T. A., HOFMAN, F. M., PEN, L., SEGAL, B. H., HOLLAND, S. M. Superoxide prevents nitric oxide mediated suppression of helper T lymphocytes: decreased autoimmune encephalomyelitis in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase knockout mice. *The Journal of Immunology*, v. 164, p. 5177 – 5183, 2000.

VARONA, S., ROJOA, S. R., MARTÍNA, A., COCEROA, M. J., SERRAB, A. T., CRESPOB, T., DUARTE, C. M. M. Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 243 – 250, 2013.

VITAGLIONE, P., MORISCO, F., CAPORASO, N., FOGLIANO, V. Dietary antioxidants compounds and liver health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, p. 575 – 586, 2004.

WAGNER, R., HECKMAN, H. M., MYERS, R. R. Wallerian degeneration and hiperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. **Pain**, v.77, p.173 – 179, 1998.

WALLACE, J. L., Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547 – 1565, 2008.

WALSH, R. N., CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychology Bulletin**, v, 83, 482 – 504, 1976.

WEBER, L. W. D., BOLL. M. Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 33, p. 105 – 136, 2003.

WEYERSTAHL, P., MARSCHALL-WEYERSTAHL, H., CHRISTIANSEN, C., OGUNTMEIN, O., ADEOYE, A.O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Medica*, v. 54, p. 546 – 549, 1988.

WILSON, P. G., O'BRIEN, M. M., GADEK, P. A., QUINN, C. J. *Myrtaceae* revisited: a reassessment of infra familial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2013 – 2025, 2001.

YOSHITAKE, T., IIZUKA, R., YOSHITAKE, S., WEIKOP, P., MULLER, W. E., OGREN, S. O., KEHR, J. *Hypericum perforatum* L (St. John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *British Journal of Pharmacology*, v.142, p. 414 – 418, 2004.

YEN, F. L.; WU, T.H., LIN, L.T.; LIN, C.C. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 123 – 128, 2007.

YOUNG, I. S., Woodside, J. V. Antioxidant in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, v. 54, p. 176 – 186, 2001.

YOUNG, J. M., DE YOUNG, L. M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents, in: Chang, J.Y., Lewis, A.J. (Eds.), **Pharmacological Methods in the Control of Inflammation**. Alan R. Liss, Inc., New York, p. 215 – 231, 1989.

ZENI, A. L. B., ZOMKOWSKIA, A. D. E., DAL-CIMA, T., MARASCHINC, M., RODRIGUES, A. L. S., TASCA, C. I. Antidepressant-like and

neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 864 – 874, 2011.

ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v. 75, p. 1659–1699, 2004.

Anexo 1: Participação em outros trabalhos, durante o período 2010 – 2013.

- In vitro antioxidant activity and in vivo antidepressant-like effect of α -(phenylselanyl) acetophenone in mice, Pharmacology, Biochemistry and Behaviour, 102, 21-29, 2012.
- Synthesis of novel selenium and tellurium-containing tetrazoles: a class of chalcogen compounds with antifungal activity, Tetrahedron Letters, 53, 3091 - 3094, 2012.