

Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Óleos Essenciais de Cinco Espécies de Myrtaceae

Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Essential Oils from Five Myrtaceae Species

¹Ramos, M. F. S.;

²Siani, A. C.;

²Souza, M. C.;

²Rosas, E. C.;

^{2*}Henriques, M. G. M. O.

¹Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CCS, Bloco K, Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil.

²Laboratório de Química de Produtos Naturais e Farmacologia Aplicada, Far-Manguinhos, FIOCRUZ, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Correspondência:

E-mail: gracahen@far.fiocruz.br

Unitermos

Myrtaceae, *Eugenia*, *Psidium*, Óleos Essenciais, Atividade Antiinflamatória

Key words

Myrtaceae, *Eugenia*, *Psidium*, Essential Oil, Anti-inflammatory Activity.

Resumo

Os óleos essenciais obtidos das folhas de *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. jambolana*, *Psidium guajava* e *P. widgrenianum* (Myrtaceae) foram extraídos por arraste a vapor e analisados por CG/EM e correlação com os Índices de Retenções. Os constituintes voláteis foram testados quanto à atividade antiinflamatória nos modelos de pleurisia induzida por zimozan e lipolissacarídeo (LPS). O pré-tratamento de camundongos com os óleos até a dose de 100 mg/Kg, na forma de lipossomas p.o., não inibiram o acúmulo de leucócitos ou o extravasamento de proteínas, na pleurisia induzida por zymozan. O óleo essencial de *E. jambolana*, no entanto, foi efetiva em inibir os leucócitos totais (56% a 200 mg/Kg) e a migração de eosinófilos, na pleurisia induzida por LPS (74% a 100 mg/Kg), mas nenhuma correlação dose-resposta foi observada. O óleo essencial de *P. widgrenianum* apenas demonstrou efeito inibitório sobre a migração de eosinófilos (70% a 100 mg/Kg). Os óleos mais ativos de *E. jambolana* quanto *P. widgrenianum* também foram testados quanto à habilidade em inibir a produção de óxido nítrico in vitro. O primeiro foi extremamente potente (100%), com efeito dose-dependente, enquanto o segundo demonstrou apenas um efeito moderado (51%), quando testados abaixo das doses citotóxicas (25 µg/poço). Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais revelaram a predominância de sesquiterpenos nas espécies *E. brasiliensis*, *E. involucrata* e *P. guajava*, enquanto que os monoterpenos foram mais relevantes em *P. widgrenianum* e foram predominantes em *E. jambolana*.

Abstract

The essential oils obtained from leaves of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. jambolana*, *Psidium guajava* and *P. widgrenianum* (Myrtaceae) were extracted by steam distillation and analyzed by GC/MS and correlation of Retention Indices. The volatile constituents were assayed for their activity as anti-inflammatory agents in the zymosan and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory models. Pre-treatment of mice with any of the oils at up to 100 mg/Kg as liposomes, p. o. had no inhibitory effect on leukocyte accumulation or protein leakage in zymosan-induced-pleurisy. *E. jambolana* was however effective in inhibiting total leukocyte (up to 56% at 200 mg/Kg) and eosinophil migration in LPS-induced pleurisy (up to 74% at 100 mg/Kg), but no dose-response correlation was observed. *P. widgrenianum* showed inhibitory effect only on eosinophil migration (up to 70% at 100 mg/Kg). Both EJ and PW were also assayed for ability to inhibit in vitro nitric oxide production. EJ inhibited NO production potently (up to 100%) and in a dose-dependent manner, whereas PW showed only an effect moderate (51%), when tested below the cytotoxic dose (25 µg/well). Chromatographic profiles of the essential oils showed the predominance of sesquiterpenes in oils of *E. brasiliensis*, *E. involucrata* and *P. guajava*, whereas monoterpenes were more important in *P. widgrenianum* and predominant in *E. jambolana*.

Introdução

A família Myrtaceae é espalhada nas florestas brasileiras, e muitas espécies são cultivadas por seus frutos comestíveis. As folhas da maioria das espécies contêm consideráveis quantidades de substâncias voláteis (CRAVEIRO et al., 1981), que as tornam fontes atrativas de óleos essenciais. Muitas espécies de Myrtaceae são usadas na medicina popular. Por exemplo, as folhas de *Psidium guajava* são utilizadas como remédios antidiarréicos, estimulantes, antiinflamatórios e antibacterianos, além do tratamento de hemorragias, diabetes e vermes intestinais (GUPTA, 1995). As folhas de *Eugenia brasiliensis* são usadas como antireumáticas, e as sementes e folhas de *Eugenia jambolana* são usadas como agente antidiabético (CORRÊA, 1984).

Os decoctos das folhas de *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambos* foram efetivos como agentes antiinflamatórios nos modelos de edema de pata e de artrite induzida em ratos (SLOWING et al., 1994). A primeira espécie também diminuiu o trânsito intestinal, assim como produziu um aumento no tempo de sono induzido por pentobarbital (SCHAPOVAL et al., 1994). Efeitos similares foram observados com o extrato metanólico das folhas de *Psidium guajava* (OLAJIDE et al., 1999). A presença de glicosídeos de flavonóis nos extratos de folhas de *Eugenia uniflora* foi relacionada com a recomendação popular para o tratamento da gota (SCMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987). As propriedades antioxidantes também foram descritas para os mesmos extratos (THEODOLUZ et al., 1988). Rao e Nigam (1970) demonstraram a atividade antimicrobiana *in vitro*, para óleos essenciais de *Eugenia bracteata* e *E. jambolana*, contra organismos Gram-negativos e Gram-positivos. Limberger et al. (1998) observaram uma inibição moderada contra o crescimento de diversos fungos e bactérias, com os óleos de dezessete espécies de Myrtaceae do sudeste brasileiro. O óleo essencial de folhas de espécies de *Psidium* apresentou efeito antinociceptivo, nos modelos de contorção induzida por formalina ou ácido acético, além de inibir o edema de pata em camundongos (SANTOS et al., 1996a; SANTOS et al., 1996b; SANTOS et al., 1998). O objetivo do presente trabalho foi estudar a composição química e a atividade antiinflamatória dos óleos essenciais extraídos de folhas de cinco espécies dos gêneros *Eugenia* e *Psidium*.

Material e Métodos

Material vegetal, Extração e Análise Química

Folhas frescas de plantas cultivadas de *Psidium guajava* L. (PG), *P. widgrenianum* Berg (PW) e *Eugenia jambolana* Lamk (*Syzygium cumini* Skeels) (EJ) foram coletadas no campus da Fundação Oswaldo Cruz, cidade do Rio de Janeiro, Brasil. As folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. (EB) e *E. involucrata* DC. (*E. bracteata* Vell.) (EI) foram coletadas no município de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. As plantas foram identificadas pela Dr.^a G. M. Barrozo (*in memoriam*), e as exsicatas foram depositadas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob Nos. 326232, (PW), 326233 (PG), 326234 (EB), 326235 (EJ) e 326236 (EI). Os óleos essenciais foram obtidos por arraste a vapor, com auxílio de um dispositivo modificado de Clevenger, durante um período de 4 horas. Os Índices de Refrações foram determinados em um aparato Abbé, à temperatura ambiente.

As análises químicas dos óleos foram realizadas em um equipamento de CG/EM Hewlett Packard 6890, sob as seguintes condições: injeções de 1 µl de uma amostra de 6 mg/100 µl de CH₂Cl₂, coluna capilar HP-5 MS (30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 µm de espessura de filme); He como gás carreador, fluxo de 0.5 mL/min; temperatura de injeção 250 °C; razão de split 1/20; Ti 70 °C, ti 2 min, Tf 280 °C, taxa de aquecimento 3 °C/min; espectro de massas por impacto eletrônico, 70 eV, temperatura da fonte de íons 250 °C. Os componentes foram identificados individualmente por comparação dos espectros de massas com aqueles contidos na base de dados da biblioteca do aparelho (Wiley library software 59943B), e os Índices de Retenções foram correlacionados com referência a uma série de n-alcanos (ADAMS, 1995).

Preparação das Amostras, Animais e Reagentes

Os óleos essenciais foram dissolvidos em clorofórmio (50 mg em 10 mL) em um balão de fundo redondo. O solvente foi removido por evaporação a vácuo, até a produção de uma fina película do óleo no interior do balão e a remoção total do solvente. PBS (10 mL) foi então adicionado, e o filme foi disperso por sonicação (50 Hz, 5 min). Todos os procedimentos foram efetuados sob condições estéreis. Camundongos machos

Swiss (20-30 g), da colônia da Fundação Oswaldo Cruz foram alojados em um ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (entre 7:00h e 19:00h), com livre acesso à ração e água. As seguintes substâncias foram utilizadas: azul de Evans (Merck, Germany), lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 055-B5 (LPS), zimosan A, (todos Sigma, USA).

Ensaio antiinflamatório *in vivo*

Determinação da atividade antiinflamatória. Os animais receberam 100 mg/Kg de óleo essencial (p.o.) ou 100 mg/Kg da substância pura (i.p.) 1 hora antes do estímulo. Uma dose equivalente do veículo foi administrada ao grupo controle. A pleurisia foi induzida pela técnica de Spector (1956) modificada para camundongos por Henriques et al. (1990). Resumidamente, uma agulha adaptada (calibre 13 x 5) foi inserida cuidadosamente, na profundidade de 1 mm na cavidade torácica direita do camundongo, permitindo a injeção de zimosan (500 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) ou LPS (250 ng/cavity) em um volume de 100 μl . Os animais do grupo controle receberam volumes iguais de salina estéril. Os animais foram sacrificados por inalação de CO_2 4 ou 24h depois da injeção. Suas cavidades torácicas foram lavadas com 1 mL de PBS contendo heparina (20 IU/mL) e o fluido da lavagem foi coletado para o acesso aos leucócitos e o extravasamento do azul de Evans. A contagem dos leucócitos totais foi efetuada em um contador automático de partículas (Z1; Coulter; USA). A contagem diferencial foi realizada através de citoesfregaços (Citocentrífuga Shandon, USA), corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa, com auxílio de microscópio óptico sob objetiva de imersão (100x; Olympus, Japão).

Os camundongos receberam uma injeção intravenosa de azul de Evans (25 mg/Kg), 24 h antes do estímulo inflamatório. A lavagem pleural foi coletada nos mesmos tempos descritos acima, centrifugados (2.500 rpm por 10 min) e a absorbância do sobrenadante livre de células foi lido em um espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) a 600 nm. A significância estatística ($p < 0.05$) foi analisada por ANOVA seguida do teste de Student Newman Keuls. Os resultados foram expressos como médias \pm S.E.M. Para medida da toxicidade, os camundongos Swiss machos (20-25 g) receberam 100 mg/Kg de

compostos puros (i.p.). Uma dose equivalente de veículo foi administrada ao grupo controle. Os grupos de teste e controle (6 animais cada) foram observados durante 24h, sob condições ambientais normais e com livre acesso a alimento e água.

Ensaio antiinflamatório *in vitro*

Produção de Óxido Nítrico. Animais (camundongos Balb/c) foram sacrificados 96h após a injeção i. p. de solução a 3% de tioglicolato de sódio aquoso. As cavidades peritonias foram lavadas com 5 mL de RPMI, e a viabilidade celular foi determinada por Trypan Blue. As células foram incubadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^6$ cells/mL) e estimuladas ou não com meio enriquecido com IFN- γ mais LPS (30 ng/mL) na presença de diferentes concentrações. Após 24h, o nitrito liberado no sobrenadante foi determinado pelo método de Greiss.

Determinação da citotoxicidade. Após obtenção conforme a descrição acima, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais testados, durante 20h. Uma solução (5 mg/mL) de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium] foi então adicionada (22,5 $\mu\text{L}/\text{well}$) em todos os poços. As placas foram incubadas a 37°C por 4 h, e DMSO (150 $\mu\text{L}/\text{poço}$) foi adicionado a todos os poços, misturando-se cuidadosamente para dissolver os cristais azul-escuros. A placa foi lida em um leitor de microplaca a 540 nm.

Resultados

Os rendimentos das extrações dos óleos essenciais e seus índices de refrações foram 0,14% (η_D^{25} 1,4990) para PG; 0,62% (η_D^{25} 1,4828) para PW; 0,07% (η_D^{25} 1,5005) para EB; 0,05% (η_D^{25} 1,4970) para EJ; e 0,08% (η_D^{25} 1,5021) para EI. A composição química, assim como as abundâncias relativas (área do pico no cromatograma) dos constituintes identificados nos óleos essenciais das cinco espécies de Myrtaceae, estão listados na Tabela 1. Uma comparação do conteúdo total das espécies terpênicas presentes (hidrocarbonetos e álcoois) das cinco amostras demonstrou o maior teor de monoterpenos totais (69%) de EJ, seguido por PW (34%). Por outro lado, EB, EI e PG demonstraram conter quase 100% de sesquiterpenos (Tabela 2).

Tabela 1 - Constituintes identificados nos óleos essenciais de *Eugenia jambolana* (EJ), *Eugenia brasiliensis* (EB), *Eugenia involucrata* (EI), *Psidium guajava* (PG) e *Psidium widgrenianum* (PW)

Constituintes	Abundância relativa ¹ IR ²					
	EJ	EB	EI	PG	PW	
á-pineno	22	-	-	-	14	934
canfeno	1.7	-	-	-	-	944
benzaldeído	-	-	-	0.34	-	957
â-pineno	4.3	-	-	-	-	973
mirceno	1.9	-	-	-	-	986
acetate de (Z)-3-hexenol	0.44	-	-	-	-	1003
limoneno	7.3	-	-	1.6	3.7	1024
1,8-cineol	-	-	-	0.21	8.4	1028
cis-â-ocimeno	10	-	-	-	-	1036
trans-â-ocimeno	5.9	-	-	-	-	1045
ã-terpineno	0.8	-	-	-	2.0	1054
á-terpinoleno	1.2	-	-	-	0.7	1083
linalol	-	-	-	-	1.6	1094
2-metilbutanoic acid, 2-metilbutil ester	-	-	-	-	2.7	1098
fenchol [endo]	0.27	-	-	-	-	1108
neo-allo-ocimeno	1.6	-	-	-	-	1123
trans-pinocarveol	0.40	-	-	-	-	1133
hidrato de canfeno	0.25	-	-	-	-	1141
borneol	0.34	-	-	-	-	1159
terpinen-4-ol	0.58	0.25	-	-	0.60	1170
á-terpineol	7.0	1.6	-	-	1.3	1188
acetate de fenchila [endo]	0.72	-	-	-	-	1212
acetate de bornila	2.2	-	-	-	-	1278
ã-elemento	-	-	5.5	0.24	-	1331
á-cubebeno	-	-	0.17	-	-	1341
isoledeno	-	-	0.22	-	-	1364
á-copaeno	0.17	2.3	1.0	3.9	2.8	1369
â-bourboneno	-	1.2	0.96	-	-	1376
acetate de geranila	-	-	-	-	0.60	1376
â-elemento	-	-	7.2	-	-	1388
á-gurjuneno	-	0.32	0.72	-	-	1401
â-cariofileno	9.5	7.7	3.0	12	21	1415
ã-selineno	-	0.51	0.98	-	-	1418
â-gurjuneno	-	0.34	0.40	-	-	1424
aromadendreno	-	2.9	3.8	0.21	0.58	1433
á-humuleno	5.5	2.2	1.4	15	3.7	1446
allo-aromadendreno	-	1.7	2.3	0.56	-	1455
ã-gurjuneno	0.45	-	-	0.33	-	1462
ã-muuroleno	0.25	1.6	-	-	-	1467
ã-selineno	-	-	-	1.1	-	1465
germacreno D	-	-	5.2	1.1	-	1476
â-selineno	-	0.81	1.0	11	-	1485
valenceno	0.58	-	-	-	-	1478

Constituintes	Abundância relativa ¹ IR ²					
	EJ	EB	EI	PG	PW	
á-zingibereno	-	-	-	-	3.5	1487
á-selineno	0.33	1.6	-	10	-	1493
á-muuroleno	0.21	1.3	-	-	-	1490
bicyclogermacreno	-	-	19	-	-	1495
â-bisaboleno	-	-	-	0.47	-	1500
ã-cadineno	0.24	3.4	0.70	0.70	-	1507
7-epi-á-selineno	-	-	-	-	0.35	1510
ã-cadineno	1.4	4.8	2.3	1.0	1.4	1517
cadina-1,4-dieno	-	-	0.17	0.15	-	1524
á-cadinene	-	0.74	0.19	-	-	1529
á-calacoreno	-	0.74	-	0.19	-	1535
cariofil-5-en-12-al	-	-	-	0.61	-	1544
â-calacoreno	-	0.78	-	-	-	1557
(E)-nerolidol	0.22	-	-	0.95	-	1557
ledol	-	1.8	3.2	-	-	1562
alcohol do á-cariofileno	1.7	0.67	-	0.30	-	1562
spatuleno	-	15	-	-	-	1575
óxido de cariofileno	1.7	-	-	4.3	-	1578
globulol	-	6.4	14	-	2.4	1580
epi-globulol	-	4.9	8.0	0.16	-	1587
viridiflorol	1.4	-	-	-	1.7	1594
rosifoliol	-	2.5	4.8	-	-	1598
humuleno epóxido	0.75	-	-	4.6	-	1604
â-oploponone	-	1.7	-	0.67	-	1612
cubebol	-	2.2	-	-	-	1606
cariofil-5-en-2-â-ol	0.99	-	-	-	-	1609
trans-isolongifolanona (?)	-	-	3.0	-	-	1619
á-acorenol	-	6.8	-	-	-	1621
cis-á-copaen-8-ol	0.43	-	-	2.0	-	1622
ã-eudesmol	-	-	-	-	8.5	1625
carlofila-4,13-dien-5-â-ol	0.55	-	-	3.4	1.2	1629
hinesol	-	-	-	-	1.4	1632
cedr-8(15)-en-9-α-ol	-	-	-	7.6	-	1633
T-cadinol	0.57	9.7	3.2	0.76	-	1637
ã-eudesmol	-	-	-	-	6.8	1644
á-muurolol	-	3.5	-	5.6	-	1645
á-eudesmol	-	-	-	-	8.2	1648
á-cadinol	0.30	5.3	3.7	-	-	1651
cadaleno	-	0.45	-	0.12	-	1667
6,10,14-trimetilpentadecanone	-	-	0.11	-	-	1841
acetate de oplopanoila	-	0.45	-	-	-	1881
phytol	-	-	-	4.8	-	2119
Total identificado (%)	96	98	96	96	99	

¹ Calculado a partir das áreas relativas dos picos nos cromatogramas (injeções de 1 µl de uma solução de 6 mg da amostra em 100 µl de CH₂Cl₂). EJ: *Eugenia jambolana*, EB: *E. brasiliensis*, EI: *E. involucrata*, PG: *Psidium guajava*, PW: *P. widgrenianum*. ² IR = Índice de Retenção (ADAMS, 1995).

Tabela 2 - Constituição geral dos óleos essenciais de folhas de espécies dos gêneros *Eugenia* e *Psidium* (Myrtaceae)

Composição*	EJ	EB	EI	PG	PW
Hidrocarbonetos Monoterpênicos	57	-	-	0.37	20
Monoterpenos oxigenados	12	1.9	-	0.55	15
Monoterpenos totais	69	1.9	-	-	34
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos	19	34	58	62	33
Sesquiterpenos oxigenados	12	63	42	33	32
Sesquiterpenos totais	31	98	100	95	66

*Baseada nos cromatogramas de CG/EM. **EJ:** *Eugenia jambolana*, **EB:** *E. brasiliensis*, **EI:** *E. involucrata*, **PG:** *Psidium guajava*, **PW:** *P. widgrenianum*

A injeção intratorácica de zimosan (500 µg/cavidade) causou um aumento significativo na contagem de leucócitos totais, dentro do período de 4h de estímulo. A contagem diferencial revelou que o acúmulo de leucócitos induzido pelo zimozan foi especificamente devido à infiltração de neutrófilos. O pré-tratamento com todos os óleos essenciais (100 mg/Kg; p.o.) não modificou o acúmulo total de leucócitos, células mononucleares, neutrófilos ou eosinófilos após 4h, nem o extravasamento protéico pleural induzido por zimosan (4h) (dados não mostrados).

A Figura 1 (A-D) mostra os efeitos dos óleos essenciais sobre a pleurisia induzida por LPS. O número de leucócitos totais no fluido de lavagem pleural aumentou em 24h ($P \leq 0.05$), após a injeção i.t. de LPS, assim como os neutrófilos, eosinófilos e as células mononucleares. O tratamento com dexametasona (2 mg/Kg) reduziu os leucócitos totais de $5.15 \pm 0.55 \times 10^6$ para $2.54 \pm 0.21 \times 10^6$ e o acúmulo de eosinófilos de $0.75 \pm 0.16 \times 10^6$ para $0.15 \pm 0.05 \times 10^6$. O tratamento com EB e EI não foram capazes de inibir a migração total ou diferencial de células, induzida por LPS. O tratamento com PG reduziu significativamente ($P \leq 0.05$) as infiltrações dos leucócitos totais e as células mononucleares, medidos 24h após as injeções. Por outro lado, o tratamento com EJ inibiu significativamente os leucócitos totais, os acúmulos de células mononucleares e os eosinófilos, enquanto que PW inibiu tanto os neutrófilos quanto os eosinófilos. Com o objetivo de avaliar se os efeitos dos óleos EJ e PW ocorriam segundo um perfil dose-dependente, os camundongos que receberam uma injeção i.t. de LPS foram tratados com diferentes doses destes óleos. A Figura 2 mostra que todas as doses de EJ inibiram, de maneira similar, os acúmulos de leucócitos, células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Assim como EJ, PW não demonstrou uma atividade dose-

dependente, e apenas foi capaz de inibir o acúmulo de eosinófilos na cavidade pleural (Figura 3).

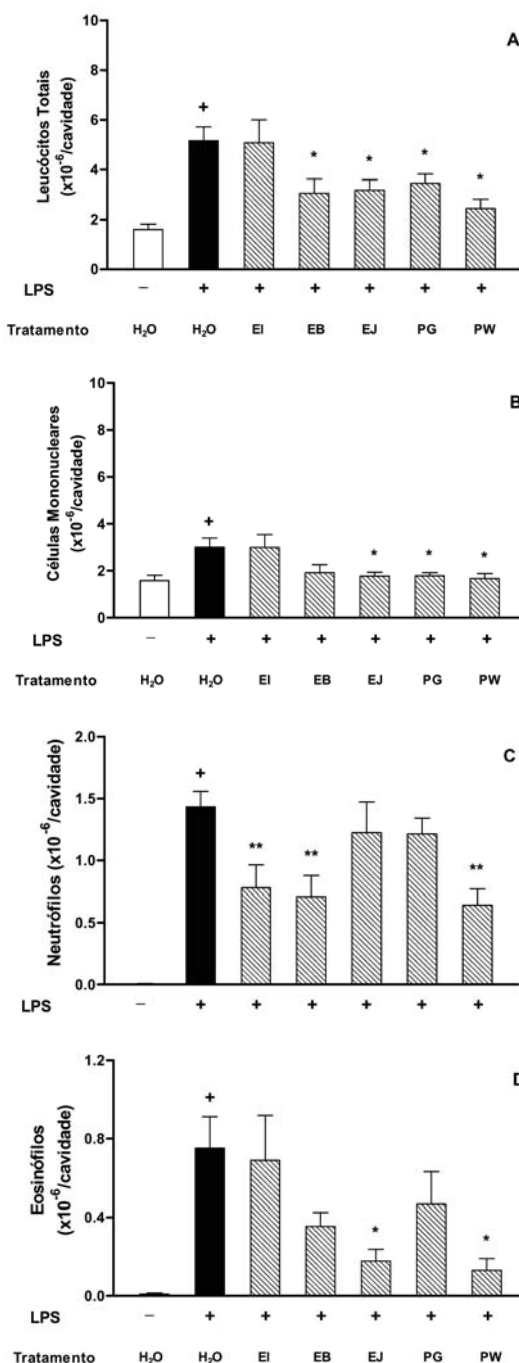
Figura 1 - Efeito inibitório do pré-tratamento com óleos essenciais de Myrtaceae (p.o.) na indução por LPS, após 24h, no acúmulo de: leucócitos totais (A), células mononucleares (B), neutrófilos, (C) e eosinófilos (D). * = $p \leq 0.05$ e ** = $p \leq 0.01$, em relação ao grupo injetado com LPS; + = ≤ 0.001 , em relação aos animais do grupo controle, injetados com salina.

Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *Eugenia jambolana*, após 24h, na indução por LPS no recrutamento de: leucócitos totais (A), células mononucleares (B), neutrófilos, (C) e eosinófilos (D). Óleo (50-400 mg/Kg; colunas hachuradas) ou veículo (colunas vazadas) administrados p.o. 1h antes do LPS (250 ng/cavidade) e fluido pleural coletado 24h depois. + e * indicam $P < 0.05$, quando comparado ao controle não estimulado, injetado com salina (colunas vazadas) ou com o grupo estimulado com LPS tratado com salina, (colunas fechadas) respectivamente.

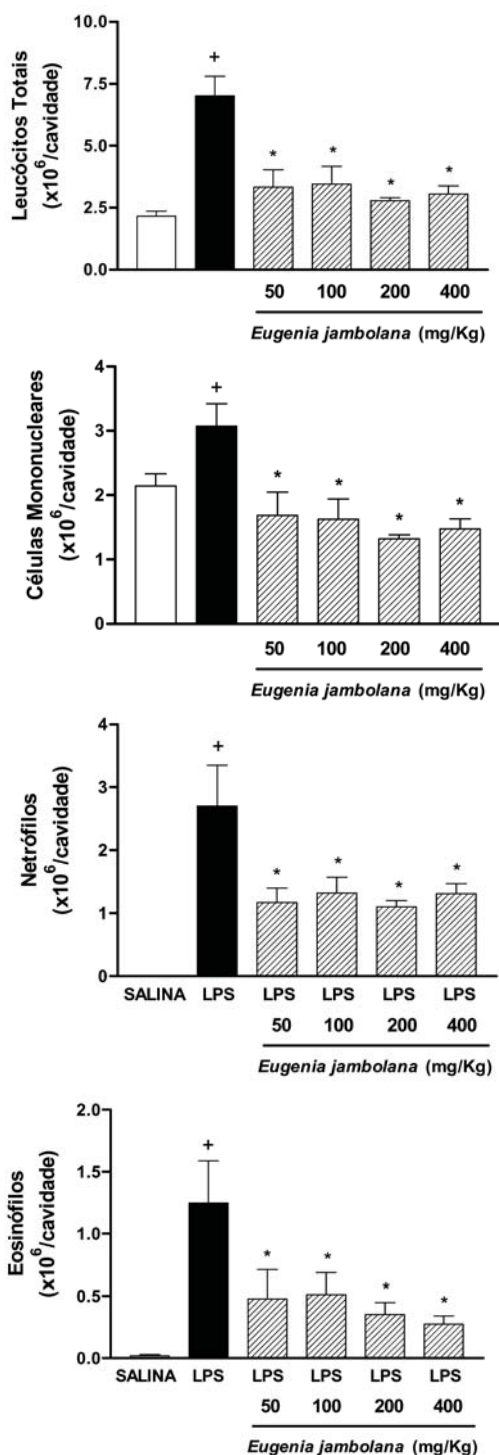
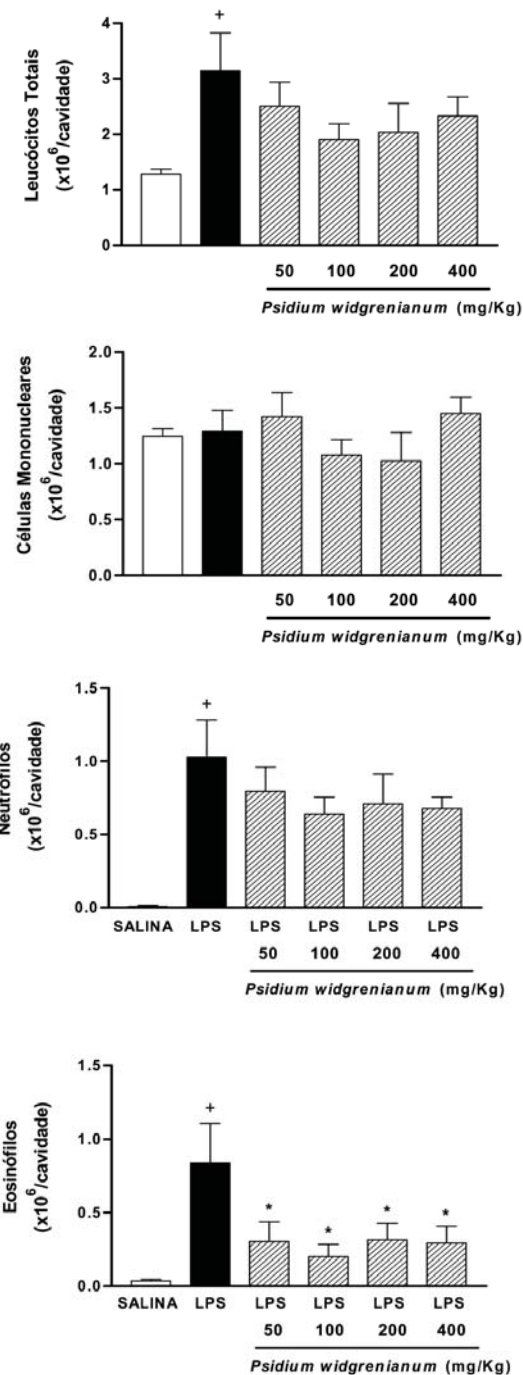


Figura 3 - Efeito do óleo essencial de *Psidium widgrenianum*, após 24h, na indução por LPS no recrutamento de: leucócitos totais (A), células mononucleares (B), neutrófilos, (C) e eosinófilos (D). Óleo (50-400 mg/Kg; colunas hachuradas) ou veículo (colunas vazadas) administrados p.o. 1h antes do LPS (250 ng/cavidade) e fluido pleural coletado 24h depois. + e * indicam $P < 0.05$, quando comparado ao controle não estimulado, injetado com salina (colunas vazadas) ou com o grupo estimulado com LPS tratado com salina (colunas fechadas), respectivamente.



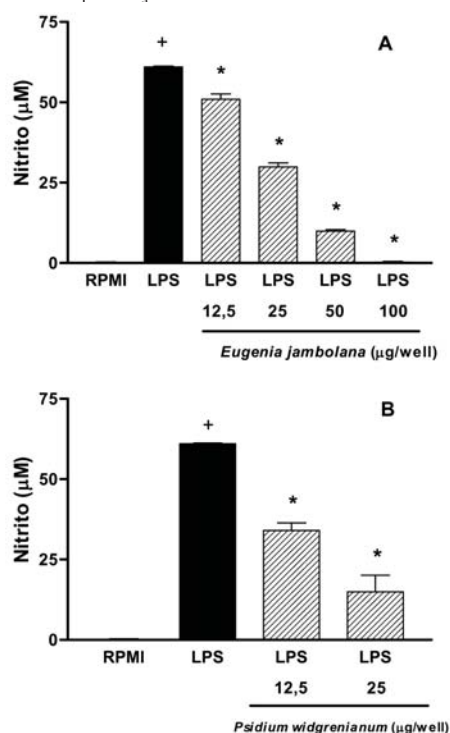
Os efeitos citotóxicos de EJ e PW foram avaliados em cultura de macrófagos peritoniais. Conforme exposto na Tabela 3, PW foi citotóxico entre 50-200 $\mu\text{g}/\text{well}$, enquanto as outras doses foram inócuas aos macrófagos; e apenas a dose de 200 $\mu\text{g}/\text{well}$ de EJ foi citotóxica. Isso tornou possível a avaliação do papel imunomodulatório destes óleos *in vitro*. Assim, usando-se doses não-tóxicas de EJ e PW, foram avaliados os seus efeitos sobre a produção de óxido nítrico. Conforme a Tabela 3, todas as doses de EJ foram bastante efetivas em inibir potencialmente (até 100%) a produção de espécies oxigenadas reativas, em maneira dose-dependente. As doses de PW inibiram a produção de NO por macrófagos na maneira dose-dependente, ensaiadas somente abaixo do nível de toxicidade (25 $\mu\text{g}/\text{well}$) (Figura 4 (A-B)).

Tabela 3 - Efeitos de *Eugenia jambolana* (EJ) ou *Psidium widgrenianum* (PW) sobre a viabilidade dos macrófagos e inibição da produção de NO*

	<i>Eugenia jambolana</i>					<i>Psidium widgrenianum</i>					
	Dose ($\mu\text{g}/\text{poço}$)	12,5	25	50	100	200	12,5	25	50	100	200
% Viabilidade celular	100	100	100	100	62	100	100	11	9	8	
% de inibição de NO	18	52	85	100	-	44	77	-	-	-	

*Valores representam a média de triplicatas.

Figura 4 - Ação dos óleos essenciais de *Eugenia jambolana* (A) e *Psidium widgrenianum* (B) na liberação *in vitro* de nitrito por macrófagos peritoniais, demonstrando a inibição dose-dependente na produção de óxido nítrico.



Resultados

As composições químicas dos óleos foram comparadas com aquelas descritas para outros quimiotipos reportados na literatura. O óleo de *E. brasiliensis* foi apenas descrito para uma espécie adaptada nas Ilhas Reunião (VERA et al., 1994). A principal diferença residiu na proporção dos monoterpenos totais, que alcança 50% na espécie cultivada no Oceano Índico. Em contraste, para a *Eugenia involuocrata* coletada no Sul do Brasil, os monoterpenos estiveram ausentes (HENRIQUES et al., 1993). Bicyclogermacrene foi a substância mais representativa no óleo, para a o caso estudado aqui (19%); acompanhado por um significativo teor de isômeros do álcool globulol, além de outros das séries do eudesmano e cadinano. No caso da *Eugenia jambolana*, pouca variação no conteúdo terpênico relativo foi observada entre os óleos essenciais de plantas coletadas no Nordeste do Brasil (CRAVEIRO et al., 1983). Em todos eles, predominaram os hidrocarbonetos monoterpênicos, particularmente os pinenos. Já a espécie *Psidium guajava* demonstrou a variabilidade de quimiotipos, reportada na literatura. Apenas os espécimens coletados na China demonstraram a predominância de monoterpenos (α -pineno e 1,8-cineol) nos óleos essenciais das folhas; porém em todos os outros quimiotipos descritos, predominaram os álcoois sesquiterpênicos do grupo eudesmano (JI et al., 1991). O óleo essencial de *Psidium widgrenianum* não foi previamente descrito. Sua composição revelou 34% de monoterpenos, com predominância de α -pineno (14%) e 1,8-cineol (8.4%). Limoneno, linalol e p-mentenos (hidrocarbonetos e álcoois) também ocorreram, em menor quantidade. Entre os sesquiterpenos, o carofileno (21%) e os isômeros do eudesmol foram os mais representativos; estes últimos constituindo juntos 24% da composição total do óleo.

Todas estas diferenças nos perfis dos óleos devem ser tomadas em consideração; quando se propõe qualquer tipo de correlação entre a composição química e os efeitos farmacológicos dos óleos. Antagonismos e efeitos sinérgicos entre os componentes sempre são sugeridos, como uma decorrência natural da complexa composição dos óleos. Apesar disso, até agora não há claras e suficientes evidências para estes fenômenos, respaldadas por investigações sistemáticas, e também não há evidências descritas para a especificidade farmacológica ou a similaridade molecular das substâncias presentes nos óleos. Muitas atividades

biológicas dos óleos essenciais (principalmente aqueles inteiramente constituídos por terpenos) têm sido descritas, contudo há pouquíssimos estudos sobre a atividade antiinflamatória desses compostos (GIL et al., 1989; OCETE et al., 1989; SIANI et al., 1999; SIANI et al., 2000; HAJHASHEMI et al., 2003; SOUZA et al., 2003). O presente estudo examinou a ação de alguns óleos essenciais, no modelo de pleurisia induzida por zimosan ou por LPS. O pré-tratamento com qualquer dos óleos estudados não inibiu o recrutamento de neutrófilos e o extravasamento protéico, pela injeção de zimosan, sugerindo que nenhum dos óleos possui atividade antiinflamatória em reações agudas. Por outro lado, a atividade antiinflamatória *in vivo* dos óleos essenciais em doses mais altas que as utilizadas neste estudo; foi reportada no modelo de edema de pata em ratos (MARTIN et al., 1993).

EJ e PW inibiram a reação inflamatória retardada, induzida por LPS (Figuras 2 e 3). Esta reação de inflamação é caracterizada pela migração de células com um importante acúmulo de eosinófilos e sem extravasamento protéico (BOZZA et al., 1994; PENIDO et al., 1997). Os leucócitos totais, células mononucleares e eosinófilos também foram inibidos significativamente por EJ e PW. O acúmulo de eosinófilo é um importante componente nos distúrbios alérgicos, em infecções por parasitas e bacterianas, tendo sido considerado uma das causas do dano tecidual de pulmão, em tais casos.

Na direção de determinar os possíveis mecanismos responsáveis pelas atividades antiinflamatórias, ambos os óleos foram avaliados quanto ao envolvimento da produção *in vitro* do óxido nítrico. Os resultados demonstraram que doses não-citotóxicas de EJ e PW inibiram a produção de NO, uma ação evidentemente responsável, pelo menos em parte, pela atividade destes dois óleos. Conforme acima descrito, LPS é um dos mais potentes elicitadores, de origem microbiana, do processo inflamatório. Ele ativa monócitos e macrófagos para produzir citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6, que por sua vez, servem como mediadores endógenos da inflamação, através da interação mediada por receptores com várias células-alvo (DOBROVOLOSKAIA; VOGEL, 2002). NO é um potente agente antimicrobiano e sua inibição não apenas limita o controle do crescimento bacteriano, mas também limita as conseqüências dos danos imunopatológicos da infecção crônica (COOPER et al., 2002). A inibição da NO sintase tem sido utilizada em pacientes doentes criticamente sépticos, como

estratégia para reverter os efeitos vasodilatadores da produção endógena de NO em paredes vasculares (WALLEY et al., 1999).

Os resultados obtidos demonstram que, embora a maioria dos óleos essenciais testados não tenha sido ativa na reação inflamatória aguda, EJ e PW foram efetivos em retardar a migração celular inflamatória. Os estudos prosseguem com a investigação de componentes específicos dos óleos mais ativos, ensaiados na forma pura. Com isto se poderá tanto determinar biomarcador(es) para a ação destes óleos neste alvo terapêutico, quanto apontar para o desenvolvimento de uma metodologia em direção à padronização da bioatividade (composição x eficácia) destes substratos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelas bolsas concedidas a M.F.S. Ramos e M.C. Souza, respectivamente.

Referências

- ADAMS, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry*. Allured Pub. Corp.: Illinois, USA, 1995.
- BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; PENIDO, C.; LARANJEIRA, A.P.; HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; CORDEIRO, R.S.B. Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation. *Journal of Leukocyte Biology*, v.56, p.151-158 1994.
- COOPER, A.M.; ADAMS, L.B.; DALTON, D.K.; APPELBERG, R.; EHLERS, S. IFN- α and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends in Microbiology*, v.10, p.221-226, 2002.
- CORRÊA, P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Imprensa Nacional: Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v.IV, p.429-430, 1984.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, G.F.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*. Editora UFC, Fortaleza, 1981.
- CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Essential oil of *Eugenia jambolana*. *Journal of Natural Products*, v.46, p.591-592, 1983.
- DOBROVOLOSKAIA, M.A.; VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection*, v.4, p.903-914, 2002.
- GUPTA, M.P. (ed.). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Ed. CYTED-SECAB: Santafé de Bogotá, p.413-420, 1995.

9. GIL, M.L.; JIMÉNEZ, J.; OCETE, M.A.; ZARZUELO, A.; CABO, M.M. Comparative study of different essential oils of *Bupleurum gibraltarium* Lamarck. *Pharmazie*, v.44, p.284-287, 1989.
10. HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p.67-71, 2003.
11. HENRIQUES, M.G.M.O.; WEG, V.B.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.R.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGAFTIG, B.B. Differential inhibition by two tetrazepne PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, v.99, p.164-168, 1990.
12. HENRIQUES, A.T.; SOBRAL, M.E.; CAUDURO, A.D.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIÈRE, 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.
13. JI, X.; PU, Q.; GARRAFO, H.M.; PANNELL, L.K. The essential oil of the leaves of *Psidium guajava* L. *Journal of Essential Oil Research*, v.3, p.187-189, 1991.
14. LIMBERGER, R.P.; APEL, M.A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.79, p.49-52, 1998.
15. MARTIN, S.; OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; JIMÉNEZ, J.; ZAZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. *Planta Medica*, v.59, p.533-536, 1993.
16. OCETE, M.A.; RISCO, S.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J. Pharmacological activity of the essential oil of *Bupleurum gibraltarium*: anti-inflammatory activity and effects on isolated uteri. *Journal of Ethnopharmacology*, v.25, p.305-313, 1989.
17. OLAJIDE, O.A.; AWE, S.O.; MAKINDE, J.M. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. *Fitoterapia*, v.70, p.25-31, 1999.
18. PENIDO, C.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; LARANJEIRA, A.; ROSAS, E.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; BOZZA, P.T.; HENRIQUES, M.G.M.O. The role of gamma-delta T lymphocytes in lipopolysaccharide-induced eosinophil accumulation into the mouse pleural cavity. *Journal of Immunology*, v.159, p.853-860, 1997.
19. RAO, B.G.V.N.; NIGAM, S.S. The in vitro antimicrobial efficiency of essential oils. *Indian Journal of Medical Research*, v.58, p.627-633, 1970.
20. SANTOS, F.A.; COSTA, A.M.L.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Estudo da atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Psidium guayanensis* Pers. (araçá-azedo). Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil: F-012, 1996a.
21. SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Atividade antinociceptiva resistente ao naxolone do óleo essencial de *Psidium pholianum* Berg (araçá-doce). Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil: F-050, 1996b.
22. SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf oil and its major constituents. *Phytoterapy Research*, v.12, p.24-27, 1998.
23. 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.
24. SCHMEDA-HIRSCHMANN G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; DE ARIAS, A.R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.21, p.183-186, 1987.
25. SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA JR., O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of antiinflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, p.57-69, 1999.
26. SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos Essenciais: Potencial antiinflamatório. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v.16, p.38-43, 2000.
27. SOUZA, M.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DELIMA JR., O.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two asteraceae species. *Pharmazie*, v.58, n.8, p.582-586, 2003.
28. SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.43, p.9-11, 1994.
29. SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v.72, p.367-380, 1956.
30. THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v.24, p.179-183, 1988.
31. VERA, R.R.; LAURENT, S.J.; FRAISSE, D.J. The volatile leaf oil of *Eugenia brasiliensis* Lam. from Réunion Island. *Journal of Essential Oil Research*, v.6, p.155-159, 1994.
32. WALLEY, K.R.; MCDONALD, T.E.; HIGASHIMOTO, Y.; HAYASHI, S. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.160, p.698-704, 1999.