



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CECÍLIA CARVALHO DE OLIVEIRA**

**ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO  
AQUOSO E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *ALPINIA  
ZERUMBET* (PERS.) BURTT & SMITH**

**FORTALEZA**

**2008**

CECÍLIA CARVALHO DE OLIVEIRA

ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO AQUOSO E DO  
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *ALPINIA ZERUMBET* (PERS.) BURTT &  
SMITH

Dissertação submetida à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia da Universidade Federal do  
Ceará como Requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de  
Moraes Filho

FORTALEZA

2008

O46e Oliveira, Cecília Carvalho de

Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt & Smith/ Cecília Carvalho de Oliveira. 2008.

93 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

1. *Alpinia*. 2. Toxicologia. 3. Genotoxicidade. I. Moraes Filho, Manoel Odorico de (orient.). II. Título.

CDD 615.905

CECÍLIA CARVALHO DE OLIVEIRA

ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO AQUOSO E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *ALPINIA ZERUMBET* (PERS.) BURTT & SMITH

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como Requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

A transcrição de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita conforme com as normas de ética científica.

Aprovada em: 15/07/2008

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Universidade Federal do Ceará -UFC

---

Adriana Rolim Campos Barros  
Universidade de Fortaleza-UNIFOR

Aos **meus pais**,  
exemplos de força, perseverança, caráter e coragem;  
à minha **avó Dulce**,  
pelo carinho e pelos ensinamentos;  
ao **meu irmão**,  
que sempre foi um espelho para mim;  
ao **Carlos Windson**,  
companheiro de horas difíceis e  
constante exemplo de coragem e fonte de estímulo sempre.

## AGRADECIMENTOS

Em especial, ao **Prof. Dr. Odorico de Moraes**, pela constante confiança em meu potencial, pelas inúmeras oportunidades de crescimento, pela orientação, pela compreensão e pelo imenso carinho que sempre demonstrou ter.

Ao meu pai, **Joaquim Aristides**, por ser sempre meu referencial. Pelas conversas e conselhos sempre recheados de bom senso, pelo apoio incondicional e principalmente pelo seu amor e confiança em mim.

A minha mãe, **Dulce Carvalho**, pelo carinho, pelos cuidados, pelas preocupações, pelo apoio, pelas conversas e principalmente pela sua torcida e tentativa de entender o que estava fazendo.

À **Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo**, pelas sugestões técnicas e pela orientação na ausência do prof. Odorico, que ajudou muito na construção deste trabalho.

À **Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, pelas sugestões técnicas e orientação na ausência do Prof. Odorico.

À **Profa. Raquel Carvalho Montenegro**, pelas orientações das técnicas experimentais e pela sempre disponibilidade a ajudar no desenvolvimento dos trabalhos.

À **Kristiana Cerqueira Mousinho**, pelas conversas, brincadeiras, gargalhadas e companheirismo, além das ajudas nos experimentos e inúmeras trocas de inseguranças, confidências e experiências na vida profissional e pessoal.

Ao **José Roberto de Oliveira Ferreira**, pelas conversas, brincadeiras, gargalhadas e companheirismo, além das ajudas nos experimentos e inúmeras trocas de inseguranças, confidências e experiências na vida profissional e pessoal.

Ao **Bruno Coelho**, pela ajuda sem tamanho, pois sem ela não teria conseguido terminar os experimentos no prazo.

Aos professores que compõem o corpo docente do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelas orientações e auxílios nos detalhes imprescindíveis do trabalho, em especial o **Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao**.

À **Dra. Adriana Rolim**, pela co-orientação e ajuda nos ensaios de toxicidade com animais.

À **Dra. Vanesca Frota**, que foi um anjo que caiu do céu para me ajudar em muitos experimentos e acabou se tornando uma grande amiga e companheira.

Aos amigos do LOE: **Michel Ferreira, Washington Barros, Hémerson Yuri, Paula Jimenez, Daniel Bezerra, Marne Vasconcellos, Danilo Damasceno, Diego Wilke, Adriana Carvalho, Arinice Costa, Delano Marinho, Ana Jérсия, Felipe, Hidemburgo, Evelyne, Crisanto Rodrigues, Venúcia Magalhães**, pelo ótimo convívio e a constante disponibilidade de ajuda e troca de experiências.

Às técnicas **Silvana França**, cuja dedicação e trabalho é indispensável à boa ordem do laboratório, além das inúmeras ajudas; **Luciana França**, pela sempre disponibilidade de ajuda e manutenção do nosso material de trabalho; e **Maria de Fátima**, pelo auxílio sempre disponibilizado.

Às secretárias **Adelânia** e **Sheyla**, pela imensa atenção e resolução dos pedidos e problemas arranjados no decorrer dessa empreitada.

À **Aura**, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela enorme contribuição para nossa formação, com suas informações preciosas e atenção aos nossos apelos desesperados de estudantes perdidos e angustiados.

Aos porteiros do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, **Chiquinho** e **Alana**, que substituiu a querida **Mônica** quando do nascimento de sua filha **Larissa**, que foi acompanhado de pertinho por mim e contribuiu enormemente para execução de alguns experimentos.

Ao **Carlos** e à **Íris**, pessoas maravilhosas e alegres que estavam sempre a trabalhar para manter o nosso laboratório e Departamento limpo e organizado. **Íris**, obrigada pelo cafezinho sempre fresco e cheiroso e pelas conversas.

Ao **Seu Bento** e aos **seus filhos**, responsáveis pela manutenção do biotério e pelo bem-estar e higiene dos nossos animais, carinhosamente tratados por “bebês”.

Aos amigos do LPN, em especial à **Cínthya lamille** e toda **sua família**, à **Silvéria**, ao **Michael Will** e ao **Otacílio**, pela troca de informações, ajudas nos experimentos e principalmente pela amizade, pelas brincadeiras e festinhas feitas nas nossas casas.

Aos amigos do LAFICA, **Roberto César** e **Roberta Dalcico**, pelo companheirismo e nossos almoços e aniversários comemorados juntos.

Aos amigos e membros da UNIFAC, em especial: **Seu Francisco** e **Seu Dantas**, porteiros, que sempre se disponibilizaram a abrir as portas (literalmente) do biotério e do laboratório para mim; ao **Seu Carlos**, pela simpatia e manutenção da limpeza dos laboratórios; à **Flávia**, secretária do CEP, pela presteza e ajuda

imprescindível ao desenrolamento dos experimentos; à **Ana Paula**, colega de curso, pela divisão de trabalho na produção do chá, nas aventuras para liofilizá-lo e pelas trocas de medos e inseguranças quanto ao futuro da nossa pesquisa; ao **Paulo Magaiver**, por tudo, desde o seu bom dia aos inúmeros consertos e favores prestados; ao **Vagnaldo Fechine**, pela imensa ajuda com os dados e estatísticas e tantas outras coisas; à **Deysi Wong**, pela amizade e eterno carinho.

À **Dra. Sônia Felício**, pelas experiências e pelos ensinamentos adquiridos para o desenvolvimento de um trabalho de qualidade e bem construído.

À **Profa. Dra. Ana de Fátima Urano Carvalho**, pelas imensas ajudas, conversas e esclarecimentos de dúvidas, além do ensinamento fundamental de manipulação e tratamento de animais de laboratório e respeito à vida animal.

À **Profa. Dra. Vânia Melo**, pelas conversas, auxílios experimentais e esclarecimentos de dúvidas em relação ao trabalho com células e bactérias.

Aos amados e queridos amigos biólogos que estão sempre perto e prontos para ajudar: **Lady Clarissa, Nara Gadelha, Nathanna Mateus, Davi Farias, Daniel Oriá e Mariana Giovenardi**, pelas horas de relaxamento, brincadeiras e descontração, fossem no laboratório de Fisiologia Animal ou no Fone Pizza e pelas muitas conversas e trocas de experiências para sobrevivência até o final do nosso objetivo, a conclusão do curso de pós-graduação.

A minha avó, **Maria Dulce**, pelos mimos, pelos carinhos, pelas orientações, pela torcida e por ser essa pessoa sempre maravilhosa em minha vida.

Ao meu irmão, **Joaquim Pedro**, por sempre ter sido minha figura de exemplo, pelas ajudas e auxílios, principalmente em relação às tecnologias e pela sua enorme torcida.

A minha cunhada, **Lorena Veras**, pelo carinho e pela torcida.

À **Beatriz Carvalho**, prima querida e amada, pelas várias ajudas, principalmente em relação ao inglês e traduções, pelo carinho e pela imensa torcida.

À toda minha família pelo apoio e torcida pelo cumprimento de mais essa etapa em minha vida.

À **Dra. Selva Aguiar**, sem seu incondicional apoio emocional, não teria chegado até aqui com tanta garra, alegria e tranquilidade.

Ao meu namorado, **Carlos Windson Cavalcante Mota**, pessoa muito especial, pelas injeções de coragem, pelos seus incentivos, pelas nossas conversas, pela sua segurança passada nos momentos mais difíceis, pelo seu apoio, pelo seu

carinho, pela sua compreensão e por você ter ficado ao meu lado sempre, durante todo esses anos, além de tornar os meus dias mais coloridos.

## RESUMO

*Alpinia zerumbet*, conhecida popularmente como colônia no Nordeste do Brasil, é uma planta medicinal usada amplamente na medicina popular na forma de chás e infusões para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial. O intenso consumo popular dessas infusões levou-nos a avaliar o perfil toxicológico e genotoxicológico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *A. zerumbet*. Esse estudo foi avaliado pelos ensaios de curta duração *in vivo* e *in vitro*. Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade e o efeito hemolítico *in vitro*, porém não houve resposta tóxica. A DL<sub>50</sub> encontrada para o extrato aquoso foi >5 g/Kg, demonstrando que os princípios ativos do extrato apresentam baixa toxicidade. Os estudos de genotoxicidade foram realizados *in vivo*. Os animais foram tratados, por via oral, com três doses do extrato aquoso (2 g/Kg, 3,5 g/Kg e 5 g/Kg) e com a dose de 400 mg/Kg do óleo essencial. Após 24h e 48h, o sangue periférico e a medula óssea foram coletados. No ensaio do cometa não houve detecção de nenhum cometa de grau elevado e as análises estatísticas demonstraram um  $P < 0,01$  (grau de significância:  $P < 0,05$ ) para todas as amostras em relação ao controle positivo e um  $P > 0,05$  (grau de significância:  $P < 0,05$ ) para as amostras em relação ao controle negativo. No ensaio do micronúcleo, todas as doses do extrato aquoso e do óleo essencial tiveram diferença estatisticamente significativa em relação a ciclofosfamida, um antineoplásico citotóxico, com um  $P < 0,001$  e um  $P > 0,05$  em relação ao controle negativo (significância:  $P < 0,05$ ). Todos esses resultados indicam que o extrato aquoso e o óleo essencial das folhas de *A. zerumbet* não apresentam ações citotóxicas nem genotóxicas nos modelos testados.

Palavras-chave: *Alpinia*. Toxicologia. Genotoxicidade.

## ABSTRACT

*Alpinia zerumbet*, known ordinarily as colony in Northwestern Brazil, is a medicinal plant widely used in popular medicine as tea and infusions for the treatment of intestinal and cardiovascular illnesses, such as hypertension. Due to the high levels of consumption of such infusions, we have sought to evaluate the toxicological and genotoxicological profile of the tea and essential oil made from *A. zerumbet* leaves. This study has been evaluated by short term *in vivo* and *in vitro* trials. We initially evaluated the cytotoxicity and the hemolytic effect *in vitro*; however, there was no toxic response. The DL<sub>50</sub> found for the tea was of >5 mg/Kg, which demonstrates that the active principles of the tea present low toxicity. The genotoxicity trials were carried out *in vivo*. The animal received treatment orally, with three doses of the tea (2 g/Kg, 3,5 g/Kg and 5 g/Kg) and with a dosage of 400 mg/Kg of the essential oil. Peripheral blood and bone marrow were collected after 24 and 48 hours. In the comet trial no high level comets were detected and the statistical analyses demonstrate a P<0,01 (significance: P<0,05) for all samples when compared to the positive control and a P<0,05 (significance: P<0,05) for samples in relation to the negative control. In the micronucleus test, all doses of the tea and essential oil presented a statistically significant difference in relation to cyclofosfamide, with a P < 0.001 and a P > 0.05 compared with the negative control (significance: P<0,05). All those results indicate that the tea and essential oil made from *A. zerumbet* leaves do not present cytotoxic or genotoxic action in the tested models.

Keywords: *Alpinia*. Toxicology. Genotoxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CEME</b>	Central de Medicamentos
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>CPA</b>	Ciclofosfamida
<b>DDA</b>	Dose diária aceitável
<b>DDK</b>	Dihidro-5,6-deidrokawaina
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal média
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleotídeo
<b>DPM</b>	Desvio padrão da média
<b>EA</b>	Extrato aquoso
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EPC</b>	Eritrócitos policromáticos
<b>ENC</b>	Eritrócitos normocromáticos
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration
<b>ICCVAM</b>	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IM</b>	Índice de mutagenicidade
<b>LMP</b>	Low melting point

<b>MEIC</b>	Multicentre Evaluation of Cytotoxicity <i>in vitro</i>
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazolim brometo
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NMP</b>	Normal melting point
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>q. s. p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RM</b>	Razão de mutagenicidade
<b>SCGE</b>	Single Cell Gel Electrophoresis Assay
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TAC</b>	Toxicidade Aguda de Classe
<b>TDF</b>	Teste da Dose Fixa
<b>TUD</b>	Teste do “Up and Down”
<b>US-EPA</b>	United States-Environmental Protection Agency

## LISTA DE FIGURAS

1	Foto ilustrativa de um espécime de <i>A. zerumbet</i> , na época de floração.....	34
2	Foto ilustrativa das flores de <i>Alpinia zerumbet</i> , evidenciando a estrutura interna da flor e tipo de coloração nas fotos em detalhe.....	34
3	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> após 24h de exposição em camundongos fêmeas.....	59
4	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> após 48h de exposição em camundongos fêmeas.....	59
5	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> após 24h de exposição em camundongos machos.....	60
6	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> após 48h de exposição em camundongos machos.....	60
7	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do óleo essencial de <i>A. zerumbet</i> após 24h de exposição em camundongos fêmeas.....	61
8	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do óleo essencial de <i>A. zerumbet</i> após 48h de exposição em camundongos fêmeas.....	61
9	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do óleo essencial de <i>A. zerumbet</i> após 24h de exposição em camundongos machos.....	62
10	Gráfico do ensaio do cometa in vivo do óleo essencial de <i>A. zerumbet</i> após 48h de exposição em camundongos machos.....	62
11	Fotomicrografia de cometa do tipo 1.....	63
12	Fotomicrografia do cometa, evidenciando vários cometas do tipo zero.....	63
13	Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos (PCE) apresentando micronúcleo.....	68
14	Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos (EPC) apresentando micronúcleo e eritrócitos normocromáticos (NCE).....	68

## LISTA DE TABELAS

1	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade in vitro através do método do MTT.....	48
2	Atividade citotóxica do extrato aquoso e do óleo essencial de A. zerumbet em células tumorais pelo MTT.....	55
3	Atividade citotóxica do extrato aquoso e do óleo essencial de A. zerumbet em linfócitos normais pelo alamar Blue.....	56
4	Atividade hemolítica do extrato aquoso e do óleo essencial de A. zerumbet em eritrócitos de camundongo 2%.....	56
5	Efeito de doses orais únicas do extrato aquoso de A. zerumbet em camundongos machos.....	57
6	Efeito de doses orais únicas do extrato aquoso de A. zerumbet em camundongos fêmeas.....	58
7	Tabela representativa dos resultados do ensaio do micronúcleo do extrato aquoso de A. zerumbet.....	65
8	Tabela representativa dos resultados do ensaio do micronúcleo do óleo essencial de A. zerumbet nos animais sacrificados com 24h....	66
9	Tabela representativa dos resultados do ensaio do micronúcleo do óleo essencial de A. zerumbet nos animais sacrificados com 48h....	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Toxicologia.....</b>	<b>17</b>
1.1.1	Histórico.....	17
1.1.2	Divisão metodológica da toxicologia (Como Ciência).....	17
1.1.3	Fatores que influenciam na toxicidade.....	18
1.1.4	Principais agentes tóxicos.....	18
1.1.5	Causas mais freqüentes de intoxicação.....	18
1.1.6	Parâmetros Toxicológicos.....	19
1.1.7	Toxicidade aguda.....	20
1.1.8	Citotoxicidade.....	21
1.1.9	Mutagenicidade e Genotoxicidade.....	22
1.1.10	Ensaio do Cometa.....	24
1.1.11	Ensaio do Micronúcleo.....	25
<b>1.2</b>	<b>Produtos naturais.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3</b>	<b>Histórico do uso de produtos naturais.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4</b>	<b>Fitoterápicos.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5</b>	<b>A planta.....</b>	<b>32</b>
1.5.1	Alpinia zerumbet.....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Equipamentos.....	39
3.1.2	Soluções.....	40
3.1.3	Reagentes e fármacos.....	43
3.1.4	Modelos biológicos.....	44
<b>3.2</b>	<b>Preparação do óleo essencial e do extrato aquoso liofilizado utilizado no tratamento.....</b>	<b>45</b>

<b>3.3</b>	<b>Ensaio de Citotoxicidade pelo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo).....</b>	<b>46</b>
3.3.1	Análise dos dados.....	47
<b>3.4</b>	<b>Ensaio de Citotoxicidade pelo “Alamar Blue”.....</b>	<b>48</b>
3.4.1	Análise Estatística do “Alamar Blue”.....	50
<b>3.5</b>	<b>Teste de hemólise.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6</b>	<b>Toxicidade Aguda.....</b>	<b>51</b>
<b>3.7</b>	<b>Ensaio do cometa.....</b>	<b>52</b>
<b>3.8</b>	<b>Ensaio do Micronúcleo.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Ensaio de Citotoxicidade pelo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo).....</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade pelo Alamar Blue.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Teste de hemólise.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Toxicidade aguda.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5</b>	<b>Ensaio do cometa.....</b>	<b>58</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio do micronúcleo.....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TOXICOLOGIA

É a ciência que estuda as intoxicações, os venenos que as produzem, seus sintomas, seus efeitos, seus antídotos e seus métodos de análise. O termo tóxico vem do grego *toxicon*, que quer dizer “flecha envenenada” (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008; BARILE, 2007).

### 1.1.1 Histórico

A fase do descobrimento teve início com o homem primitivo em seu contato com a natureza como meio de sobrevivência, que em seu dia a dia tomou contato com plantas e animais, surgindo deste contato a identificação de substâncias que eram ou não benéficas a sua vida. A fase primitiva é, talvez, a parte mais importante, pois estuda os venenos como meio de suicídio, de homicídio e até punitivo, trazendo importantes conclusões inclusive para a toxicologia moderna. A fase moderna teve início a partir de 1800, com o surgimento de métodos de estudos para identificação de venenos, o que provocou a redução de atuação criminosa, porém a partir deste conhecimento houve um aumento significativo de intoxicações acidentais (ex. uso de agrotóxicos) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

### 1.1.2 Divisão Metodológica da Toxicologia (Como Ciência)

**Toxicologia clínica** - Estuda os sintomas e sinais clínicos, visando diagnosticar envenenamentos e orientar terapia;

**Toxicologia profilática** - Estuda a poluição da água, terra, ar e alimentos, procurando manter e aumentar a segurança para a vida e saúde humana;

**Toxicologia industrial** - Estuda as enfermidades industriais e a insalubridade do ambiente de trabalho;

**Toxicologia analítica** - Visa a análise dos produtos tóxicos objetivando determinar sua toxicidade, sua concentração tóxica, metabolismo, dentre outras;

**Toxicologia forense** - Estuda os aspectos médico-legais procurando esclarecer a “causa-mortis” em intoxicações, visando o esclarecimento e a justiça da causa das intoxicações (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

#### 1.1.3 Fatores que influenciam na Toxicidade

- ✓ Fatores que dependem do sistema biológico: idade, peso corpóreo, temperatura, fatores genéticos, estados nutricionais e patológicos;
- ✓ Quantidade ou concentração do agente tóxico;
- ✓ Estado de dispersão: é importante a forma e o tamanho das partículas;
- ✓ Afinidade pelo tecido ou organismo humano;
- ✓ Solubilidade nos fluídos orgânicos;
- ✓ Sensibilidade do tecido ou organismo humano;
- ✓ Fatores da substância em si. (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

#### 1.1.4 Principais Agentes Tóxicos

- ✓ Tóxicos Gasosos;
- ✓ Tóxicos Voláteis;
- ✓ Tóxicos Orgânicos Fixos;
- ✓ Tóxicos Orgânicos Metálicos;
- ✓ Tóxicos Orgânicos Solúveis (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

#### 1.1.5 Causas mais freqüentes de Intoxicações

As principais causas de intoxicações no trabalho são: falhas de técnicas (como vazamentos dos equipamentos, preparação e aplicação dos produtos sem a utilização de equipamento adequado de segurança, aplicação contra o vento);

trabalhadores que não trocam diariamente de roupa; trabalhadores que não tomam banho diário ou que tomam banho em água quente, que dilata os poros e facilita a absorção do produto; trabalhadores, que nos horários de descanso, alimentam-se sem lavar as mãos; armazenamento inadequado dos produtos químicos; ingestão ou inalação de produtos químicos desconhecidos na tentativa de estabelecer qual substância se trata (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008; BARILE, 2007).

Outras causas: aplicação de produtos nas horas de maior temperatura (na qual o calor intenso dilata os poros e facilita a absorção da pele); trabalhadores que voltam a trabalhar após uma intoxicação ou em períodos de repouso de outras doenças; trabalhadores com baixa resistência física são mais suscetíveis; trabalhadores que fazem aplicações de produtos químicos sozinhos e, em caso de intoxicação, não recebem ajuda imediata; crianças e animais que tem contato com produtos químicos. As esposas dos operários se intoxicam ao lavar as roupas utilizadas na aplicação dos produtos dentre muitas outras formas (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

#### 1.1.6 Parâmetros Toxicológicos

**Toxicidade aguda** - É aquela produzida por uma única dose, seja por via oral, dérmica, intraperitoneal, subcutânea ou pela inalação dos vapores.

**Toxicidade crônica** - É aquela que resulta da exposição contínua a uma substância, sendo que esta não pode causar toxicidade aguda por apresentar-se em baixas concentrações. A toxicidade crônica é mais importante que a toxicidade aguda, pois normalmente ocorre pela contaminação de alimentos ou lentamente no seu ambiente de trabalho.

**Veneno** - É todo e qualquer produto natural ou sintético, biologicamente ativo que, introduzido no organismo e absorvido, provoca distúrbios da saúde, inclusive morte, ou, se aplicado sobre tecido vivo é capaz de destruí-lo.

**Toxicidade** - É a capacidade de uma substância química produzir lesões, sejam elas físicas, químicas, genéticas ou neuropsíquicas, com repercussões comportamentais.

**Intoxicação** - É um estado deletério manifestado pela introdução no organismo de produto potencialmente danoso.

**DL<sub>50</sub> (Dose Letal)** - É a dose letal média de um produto puro em mg/Kg do peso do corpo. Esta terminologia pode ser empregada para intoxicação oral, dérmica, subcutânea, intraperitoneal ou inalatória.

**Dosagem Diária Aceitável (DDA)** - Quantidade máxima de composto que, ingerida diariamente, durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde.

**Efeito Residual** - Tempo de permanência do produto nos tecidos, no solo, ar ou água podendo trazer implicações de ordem toxicológica.

**Antídoto** - Toda substância que impede ou inibe a ação de um tóxico.

**Toxicidade Aguda** - O processo tóxico em que os sintomas aparecem nas primeiras 24 horas após a exposição à substância.

**Toxicidade Crônica** - Processo tóxico em que os sintomas aparecem após as primeiras 24 horas, ou mesmo semanas ou meses após a exposição à substância.

**Toxicidade Recôndita** - É o processo tóxico em que ocorrem lesões, sem manifestações clínicas (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

#### 1.1.7 Toxicidade aguda

A determinação da toxicidade aguda de uma substância é extremamente importante, principalmente considerando o uso indevido de produtos naturais pela população (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2008).

Depois de muitos anos de debates e discussões o teste da DL<sub>50</sub> (dose letal mediana) foi finalmente banido das diretrizes que norteiam a avaliação da toxicidade aguda (BOTHAM, 2002). A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e, apropriadamente, rotular substâncias de acordo com o seu potencial de

letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as conseqüências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE *et al.*, 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO *et al.*, 2006; COECKE *et al.*, 2005).

#### 1.1.8 Citotoxicidade

Durante um evento organizado pela ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) em 2002, a situação corrente dos métodos *in vitro* para a avaliação da toxicidade aguda oral foi estudada. Deste estudo, um processo foi iniciado para oferecer objetivos realísticos em curto prazo e longo prazo para o refinamento e substituição de estudos animais, pelo menos para a toxicidade aguda oral, sendo os mesmos princípios aplicáveis à toxicidade dérmica e inalatória.

Embora naquele momento os ensaios de citotoxicidade *in vitro* ainda não estivessem padronizados e validados, ou mesmo existissem protocolos otimizados e modelos preditivos, estudos consistentes da literatura apontavam para uma correlação positiva entre citotoxicidade *in vitro* e efeitos tóxicos agudos *in vivo*, a aplicação de métodos *in vitro* tinha um importante potencial. O documento final concluiu que a proposta de Spielmann *et al.* (1999), na qual a citotoxicidade basal medida em uma ou mais células ou linhagens celulares estava relacionada com a toxicidade aguda *in vivo*, poderia ser rapidamente absorvida para otimizar a seleção da dose inicial nos testes da dose fixa, teste de classe e o teste "Up and Down". Este

procedimento reduziria significativamente o uso de animais, o que iria ao encontro dos anseios da sociedade e comunidade científica.

Todavia, durante o evento também concluiu-se que a substituição de testes em animais pelos ensaios *in vitro* ainda era prematura e necessitaria de muito mais tempo para ser implementada. Conclusões adicionais foram o desenvolvimento, padronização e a validação de métodos *in vitro* para a predição de toxicidade em humanos ao invés de roedores a serem conduzidas como medidas a longo prazo. Diante disso, os estudos de Ekwall (1999), denominado “Multicentre Evaluation of Cytotoxicity *in vitro*” (MEIC), o qual investigava a correlação entre concentrações sanguíneas letais agudas humanas e citotoxicidade basal em uma bateria de três linhagens celulares humanas, foram indicados como um dos estudos mais promissores a serem validados e implementados.

A citotoxicidade basal é definida como “os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo” (VALADARES, 2006). A avaliação da citotoxicidade basal é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada à partir da curva de concentração-efeito. Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos. Os ensaios mais freqüentemente empregados para a avaliação de citotoxicidade basal são, o teste de redução do tetrazolium MTT e o teste da captação do corante vital vermelho (VALADARES, 2006).

#### 1.1.9 Mutagenicidade e Genotoxicidade

O DNA sofre alterações denominadas mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, durante a divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam em

mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras, porém, podem determinar a morte celular e, por consequência, não são, também, detectáveis. Dessa forma, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens ou um crescimento desordenado das células (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Os chamados agentes mutagênicos são aqueles que alteram a seqüência de bases no DNA, provocando a aceleração ou aumentam o aparecimento de mutações, que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando o aparecimento do câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Os agentes mutagênicos podem ser endógenos (óxido nítrico, radicais livres de oxigênio, nitrosaminas endógenas), ocupacionais (produtos petroquímicos, energia nuclear, produção de ferro e aço), dietéticos (mutágenos naturais presentes na dieta, mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos, mutágenos gerados no processo de preservação dos alimentos), radiação (exposição médica-raios X para diagnóstico e terapias, exposição ao lixo nuclear), poluição (efluentes industriais, subprodutos da cloração da água, emissões por motores de veículos, pesticidas utilizados na agricultura, incineração de lixo), biológico (mutágenos gerados por infecções crônicas por vírus, bactérias ou parasitas) (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A Genética Toxicológica avalia os efeitos genotóxicos em potencial, uma vez que são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A toxicidade genética não é uma medida da carcinogenicidade, mas é freqüentemente usada como um indicador para o câncer uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese, havendo associação elevada entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem. Os testes de

toxicidade genética são utilizados para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Um número de testes de curta-duração está disponível para avaliação do perigo genético. Esses modelos são categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação íntima desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, com os mecanismos conhecidos de ativação de protooncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

#### 1.1.10 Ensaio do Cometa

O ensaio do Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE)) não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. O ensaio avalia o dano ao DNA de células simples baseado na migração do DNA desnaturado em um campo eletroforético (ÖSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH *et al.*, 1988). Células individuais ou núcleos são embebidos em agarose, lisadas para expor o DNA, tratado com agentes alcalinos para desnaturar/relaxar o DNA, logo após é realizada a eletroforese para separar o DNA (TICE *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2003). O DNA é visualizado pela coloração de prata ou através de corantes fluorescentes. Danos ao DNA contendo margens rompidas migram mais no gel que o DNA intacto, criando uma imagem que lembra um cometa no céu. Quando realizado sob condições alcalinas, o ensaio do cometa detecta (mas não distingue entre) dupla-fita quebrada, fita-simples quebrada, sítios sensíveis à alcalinidade (fitas-simples quebradas), reparo de excisão incompleto (dupla-fita quebrada), interações DNA-DNA e interações proteínas-DNA. A especificidade do ensaio do cometa pode ser aumentada para investigar tipos específicos de danos ao DNA pela adição de enzimas modificadoras do DNA. Enzimas que têm tido sucesso estão sendo utilizadas no ensaio do cometa, como a Mut M (Fpg) para danos oxidativos, AlkA para danos de alquilação, Endo III para pirimidinas oxidadas e Proteinase K para interações DNA-proteínas. O teste do cometa pode ser utilizado também para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o

tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir fidedignidade do processo de reparo.

Por sua simplicidade e relativo baixo custo, o teste do cometa é promissor para avaliação de produtos químicos em larga escala. O teste pode ser utilizado para distinguir entre danos genotóxicos ou citotóxicos, *in vitro*, ou entre cancerígenos de ação genotóxica ou não genotóxica, *in vivo* de um composto químico ou industrial. Análises podem incluir organismos, tecidos ou cultura dos quais uma célula simples ou o núcleo possa ser isolado. O cometa resultante do DNA é analisado visualmente pela estimativa da extensão do dano ao DNA ou medida do tamanho da cauda. Ferramentas para análise de imagens estão disponíveis para analisar os vários parâmetros do cometa, incluindo a percentagem de migração do DNA e tamanho da cauda. O teste do cometa pode integrar as baterias de testes *in vitro/in vivo* usadas para fins de regulamentação de produtos químicos, uma vez que se encontra validado para este fim (TICE *et al.*, 2000).

#### 1.1.11 Ensaio do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987). Os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão, que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal e são formados por fragmentos acêntricos ou por cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase. Eles aparecem nas células-filha em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras, podem não ser incorporados no núcleo principal das células-filha após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, que será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os micronúcleos podem ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o micronúcleo irá conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Dentre os testes de avaliação de genotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos, produzidos por quebras cromossômicas, ou ainda de cromossomos inteiros que sofrem retardo em relação aos demais, durante a migração para os pólos da célula em anáfase durante a divisão celular. A avaliação da incidência de micronúcleos vem sendo amplamente utilizada para detectar dano cromossômico estrutural. Evans *et al.* (1959) usaram a frequência de micronúcleos para medir o dano citogenético induzido em plantas por irradiações. Högstedt e colaboradores (1981a, b) demonstraram *in vivo* a ação citogenética de diversas substâncias no esfregaço de medula óssea por meio do teste de micronúcleos. Na década de 70, o teste de micronúcleos tornou-se viável e confiável através do estudo de eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos, passando a ser um dos mais úteis indicadores de dano citogenético na medula óssea (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975).

Mais recentemente, o teste de micronúcleo emergiu como um dos métodos recomendados para avaliar os danos do cromossomo, uma vez que este método permite a avaliação confiável tanto da perda quanto da ruptura do cromossomo, (FENECH, 2005). Conseqüentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear, pós o dano ao DNA, fosse idêntica (FENECH *et al.*, 1997).

## **1.2 Produtos naturais**

Desde o início da colonização brasileira, o interesse pelos produtos naturais originados de plantas nativas tem sido despertado e explorado. Atualmente, novos seres vivos, além das plantas, vêm sendo alvo de exploração para a descoberta de novos produtos naturais com propriedades medicinais, como por exemplo, os animais marinhos, especialmente as esponjas (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

A importância dos produtos naturais ultrapassa os limites de simples exploração da natureza (GOTTLIEB; KAPLAN, 1983).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A intensidade dessa afirmação é facilmente observada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (PANDEY, 1998; CRAGG *et al.*, 1998; VERPOORTE, 1998; SHU, 1998; HARVEY, 2000; De SMET, 1997). A terapêutica moderna composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos (VERPOORTE, 1998).

Embora menos da metade da biodiversidade mundial tenha sido estudada, 140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo de plantas superiores e de microrganismos, foram isolados e caracterizados, mas ainda não foram avaliados biologicamente (VERPOORTE, 1998). O interesse pela biodiversidade para a produção de medicamentos aumentou sensivelmente com a conclusão do genoma humano, uma vez que o número de possíveis alvos terapêuticos aumentou sensivelmente com esses novos conhecimentos.

Graças aos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos ou de plantas, os cientistas puderam compreender fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular e a eletrofisiologia, permitindo que enzimas, receptores (como exemplo, receptores nicotínicos), canais iônicos e outras estruturas biológicas fossem identificados, isolados e clonados. Isso possibilitou à indústria farmacêutica desenhar drogas dotadas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias de maior complexidade. Além disso, os produtos naturais são usados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico. Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais, pois oferecem vantagens como: grande quantidade de estruturas químicas,

muitas delas, complexas; muitas classes de estruturas homólogas; estruturas químicas bi e tridimensionais; possibilidade de utilização como banco de moléculas para ensaios de alta velocidade; economia de tempo e recursos; fonte de pequenas moléculas para alvos moleculares complexos e, mais importante, capazes de serem absorvidas e metabolizadas pelo organismo (SHU, 1998).

Existem, todavia, problemas que dificultam o aproveitamento da biodiversidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os principais são: falta de leis específicas para o acesso a biodiversidade; grande complexidade das moléculas isoladas a partir de produtos naturais, que às vezes dificulta sua síntese; o tempo necessário para o descobrimento de moléculas líderes às vezes é longo; a descoberta pode ser dispendiosa; poucas bibliotecas de compostos naturais estão disponíveis; existem poucas informações com relação à estrutura-atividade desses compostos; freqüentemente, moléculas já conhecidas com pouco interesse, são isoladas de produtos naturais; os químicos sintéticos muitas vezes são relutantes em trabalhar com produtos naturais (STROBL, 2000).

### **1.3 Histórico do uso de produtos naturais**

Antigos egípcios, que se desenvolveram na arte de embalsamar os cadáveres para guardá-los da deterioração, experimentaram muitas plantas, cujo poder curativo descobriram de outras civilizações, crescendo, dessa forma, a fitoterapia. O papiro descoberto por Ebers em 1873 está repleto de receitas médicas em que entravam plantas em misturas com outras substâncias. Os assírios incluíam em seu receituário nada menos do que 250 plantas terapêuticas, entre as quais, o açafrão, a assa fétida, o cardamomo e a papoula. Hipócrates (460-361 a.C.), da Grécia, considerado o pai da medicina, empregava centenas de drogas de origem vegetal. Teofrasto (372-285 a.C.) em sua historia das plantas, catalogou cerca de 500 espécies vegetais. Crateus, que viveu no século I a.C., publicou a primeira obra de que se tem conhecimento na história -O Rhizotomikon- sobre plantas medicinais com ilustrações (BALBACH, 1974).

Além desses, muitos outros como Dioscórides, Plínio e os árabes Abd-Allah Ibn Ab-Bailar e Avicena, produziram obras valiosíssimas, nas quais catalogaram e descreveram numerosas espécies vegetais úteis à medicina (NEVES, 1982).

Galeno, na Idade Média, descreveu um herbário medicinal chamado de Alfabetum Galieni, no qual cerca de 300 vegetais, minerais e animais são descritos (HALLEUX-OPSOMER, 1982).

Na Idade Moderna, a medicina chinesa é a que mais se destaca. As primeiras investigações de farmacologia de ervas chinesas começaram em 1918, por um jovem chinês de Pequim, K. K. Chen, que se interessou pelas propriedades do óleo essencial do cinnamom chinês (GRIFFIN, 1979).

O interesse pelas plantas úteis no Brasil remonta desde os tempos coloniais, até mesmo com tratados volumosos, como o de Gabriel Soares de Souza (1587) e a obra de Piso (1658). Desde os primeiros dias em sua estada no Brasil, os colonizadores tentaram obter informações sobre plantas medicinais locais (GOTTLIEB; MORS, 1978).

#### **1.4 Fitoterápicos**

A fase seletiva da fitoterapia começou praticamente com Schmiedeberg (1839-1921) e seus inúmeros discípulos (GOMES, 1972).

Um emprego importante da biodiversidade refere-se a produção dos fitomedicamentos, também conhecidos como fitoterápicos. Esses medicamentos constituem-se em preparações contendo extratos padronizados de uma ou mais plantas, hoje amplamente comercializados em países pobres ou ricos. De acordo com a definição proposta pela OMS, os fitomedicamentos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado. Os constituintes responsáveis pela atividade farmacológica são, em geral, pouco conhecidos e se acredita que a ação farmacológica desses produtos envolva a interação de inúmeras moléculas presentes no extrato (CALIXTO, 2000).

Nas últimas décadas, houve um aumento expressivo no mercado mundial dos fitomedicamentos, especialmente nos países industrializados. Os países europeus, especialmente a Alemanha, os países asiáticos e os Estados Unidos, possuem os principais mercados consumidores desses medicamentos (CALIXTO, 2000; GRÜNWALD, 1995). O mercado brasileiro de fitomedicamentos atingiu, em 2001, cerca de US\$ 270 milhões correspondendo a 5.9 % do mercado brasileiro de

medicamentos, maior, portanto, que a comercialização dos medicamentos genéricos que foi de R\$ 226 milhões (5% do mercado global brasileiro) (CALIXTO, 2000).

Com a aprovação e a entrada em vigor da lei de propriedade industrial no Brasil no final da década de 90, várias indústrias farmacêuticas nacionais estabeleceram parcerias com o setor acadêmico, visando o desenvolvimento de fitomedicamentos, tendo por base a Resolução número 17 de 24/02/2000 da ANVISA, que estabelece as normas para o registro e a comercialização desses medicamentos. No Brasil, o registro de um fitomedicamento necessita de estudos científicos para a comprovação da qualidade, da eficácia e da segurança de uso. Uma das poucas iniciativas por parte do governo federal, visando estimular o uso da biodiversidade brasileira para a produção de medicamentos, foi o programa de pesquisa em plantas medicinais, idealizado e financiado pela Central de Medicamentos (CEME), que teve seu início na década de 80. Contudo, com a extinção da CEME, ocorrida no final dos anos 90, praticamente pouco restou dessa iniciativa pioneira em nosso país que, sem dúvida, deveria ter continuado. Entretanto, o programa permitiu o surgimento de vários grupos de pesquisas, especialmente nas áreas de farmacologia pré-clínica, toxicologia e de farmacologia clínica interessados no estudo das plantas brasileiras. Comparado ao desenvolvimento de um novo medicamento sintético, que envolve vultosas somas de recursos, o desenvolvimento de um fitomedicamento requer menos recursos, e também menor tempo de pesquisa. Com base no vasto conhecimento popular já existente para o uso de muitas plantas medicinais, estima-se que os custos para o desenvolvimento de um fitomedicamento não devem ultrapassar 2 a 3 % daquele previsto para o desenvolvimento de um novo medicamento sintético. Esses valores são compatíveis com o atual estágio de desenvolvimento das indústrias farmacêuticas nacionais (CALIXTO, 2000).

O grande desafio para o aproveitamento racional da biodiversidade brasileira visando à produção de medicamentos é, sem dúvida, como transformar um imenso patrimônio genético natural em riquezas, criando indústrias de base tecnológica e gerando empregos qualificados (CALIXTO, 2000).

É bastante claro, para o Brasil, a importância das plantas medicinais, considerando-se a enorme população ocupante no imenso território do país e seu

nível de renda, que nem sempre tem acesso aos medicamentos industrializados. Para essa população, os fitoterápicos desempenham um papel fundamental na manutenção das condições de saúde e cura de seus males (LAINETTI; BRITO, 1980).

O problema da qualidade dos fitoterápicos no Brasil vem sendo apontado há muito tempo. Para a manutenção e fortalecimento da indústria farmacêutica regional, considera-se necessária a melhoria da qualidade destes produtos, atendendo as exigências crescentes dos consumidores e dos órgãos de fiscalização. É preciso que as pessoas atuantes nessas áreas tenham a consciência de que produtos para uso terapêutico devem ser tratados de maneira diferenciada e responsável. Colocar no mercado produtos de segurança e eficácia estabelecidas é um princípio ético que deve nortear a produção de medicamentos (FARIAS *et al.*, 1985).

A qualidade de um produto é dada por um conjunto de fatores que incluem desde a matéria-prima, controle do processamento e controle da forma farmacêutica, até a bula, a embalagem e a propaganda. Todos esses fatores podem afetar a segurança e eficácia do produto, causando prejuízos ao consumidor (FARIAS *et al.*, 1985).

A qualidade das formulações farmacêuticas está intimamente ligada à qualidade da matéria-prima. No caso de fitoterápicos, a análise de insumos vegetais é relativamente simples; os extratos e formas farmacêuticas derivadas requerem análises mais sofisticadas, principalmente quando contém misturas de drogas vegetais. Nesses últimos, a autenticidade do produto é dada exclusivamente pela sua composição química (FARIAS *et al.*, 1985).

Na análise de matérias-primas os problemas mais freqüentes são as adulterações, a não uniformidade da composição química e as contaminações. Eles são decorrentes, em grande parte, da atual forma de exploração das plantas medicinais e da falta de controle de qualidade. De um modo geral, são utilizadas plantas silvestres, de acordo com as necessidades dos laboratórios, sem épocas ou locais definidos de coleta. Através do cultivo de plantas medicinais muitos desses problemas poderiam ser contornados, entretanto essa prática ainda é pouco usual em nosso meio (FARIAS *et al.*, 1985).

Grande parte das drogas vegetais comercializadas em nosso meio não consta em nenhuma Farmacopéia ou apenas na Farmacopéia Brasileira I (SCHENKEL, 1983). Essa farmacopéia data de 1926, sendo anterior ao desenvolvimento das técnicas cromatográficas, atualmente indispensáveis para o controle de qualidade de fitoterápicos. Em decorrência, para muitas dessas drogas, as normas farmacopéicas de identificação e qualidade atêm-se à identificação botânica da matéria-prima, o que, isoladamente, não garante a qualidade dos produtos. Muitos desses vegetais foram posteriormente estudados química e farmacologicamente: esses trabalhos encontram-se publicados em revistas especializadas ou em monografias e podem ser utilizados como recurso na elaboração de técnicas apropriadas de controle de qualidade. Também para a elaboração de bulas, processos de licenciamento e desenvolvimento de produtos são indispensáveis o acompanhamento dos trabalhos realizados ou em andamento. A pesquisa na área de plantas medicinais tem importância relevante, especialmente para as indústrias farmacêuticas locais e não pode ser ignorada pelas mesmas (FARIAS *et al.*, 1985).

## 1.5 A Planta

### 1.5.1 *Alpinia zerumbet*

A subclasse Zingiberidae inclui duas grandes ordens: Bromeliales e Zingiberales. Na ordem Zingiberales, estão incluídas as famílias Musaceae, Lowiaceae, Cannaceae, Marantaceae e Zingiberaceae (Di STASI, 2002). A família Zingiberaceae é a maior da ordem Zingiberales, constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia (CRONQUIST, 1981), expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central (TOMLINSON, 1969), além das Ilhas do Pacífico e Austrália (KRESS *et al.*, 2005). Suas espécies, principalmente da floresta primária, com média e baixa elevação, crescem em habitats sombreados ou semi-sombreados, ricos em húmus e formam grupos com troncos de tamanhos que variam de 1-3m, embora algumas espécies ao leste da linha Wallace possam crescer muito mais (DAHLGREN *et al.* 1985; KRESS *et al.*, 2005). *Alpinia regia* R. M. Sm. de Moluccas e *A. Boia* Seem das Ilhas Fiji, por exemplo, podem alcançar mais de 8m de tamanho. Algumas espécies

são encontradas em florestas montanhosas com mais de 2.000 m acima do nível do mar na Nova Guiné e Sulawesi. Entretanto, muito poucas são tolerantes às geadas (KRESS *et al.*, 2005).

*Alpinia* é o maior gênero da família, com mais de 200 espécies (CRONQUIST, 1981) e ocorre na Malásia e nas ilhas do Oceano Pacífico (DAHLGREN *et al.*, 1985). A espécie estudada, *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith, muito cultivada pela beleza de suas flores (JOLY, 1993), é conhecida pelos nomes vulgares de colônia, paco-seroca, cuité-açu, pacová (ALMEIDA, 1993), gengibre-concha (LORENZI; SOUZA, 1995), cardamomodo-mato, cardamomo-falso, cana-do-brejo, cana-domato e paco-seroso (MACHADO, 1996).

*Alpinia zerumbet* é uma planta herbácea, ligeiramente aromática, rizomatosa, robusta, perene, com colunas de 2 a 3 metros de altura, lisas, verde-claras, agrupadas em touceiras (Figura 1). As folhas são simples, lanceoladas, oblongas, pontudas, invaginantes (que abraçam o caule), dispostas disticamente, com larga bainha na base e lígula desenvolvida, verde-luzidias, com margens ciliadas com cerca de 50 a 70 cm de comprimento sobre 10 a 12 de largura e apresentam nervuras paralelas (Figura 2). As flores são ligeiramente aromáticas, dispostas em cachos grandes, protegidas por brácteas vistosas, hermafroditas, zigomorfas, terminais pendentes, amarelo-róseas com três lobos e um grande lábio (característica da família Zingiberaceae) (Figura 2). Androceu composto de um único estame fértil com grande antera e um número variável de estaminódios, em geral quatro, grandes e petalóides, que desempenham a função de atração da flor (CAMARGO, 1998; ALICE *et al.*, 1995; PANIZZA, 1998). O fruto é uma cápsula globosa, com dois centímetros de diâmetro e abriga diversas sementes. A propagação de *Alpinia* se dá por meio da divisão dos rizomas (FLORES & FOLHAS, 2008).

Muitas espécies da família têm valor econômico fornecendo alimentos (féculas dos rizomas), perfumes, condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e papel (TOMLINSON, 1969). *Zingiber officinale* Rosc., vulgarmente conhecido como gengibre, é utilizado para fins medicinais e como condimento (JOLY, 1993). No aspecto ornamental destacam-se os gêneros *Zingiber*, *Alpinia*, *Nicolaia*, *Hedychium* e *Kaempferia* pela beleza da folhagem e da inflorescência (WINTERS,

1995). A espécie *A. purpurata* (Vieill.) K. Schum.) é importante planta ornamental usada em vasos, paisagens e como flores de corte (KRESS *et al.*, 2005).



**Figura 1 - Foto ilustrativa de um espécime de *A. zerumbet*, na época de floração**



**Figura 2 - Foto ilustrativa das flores de *Alpinia zerumbet*, evidenciando a estrutura interna da flor e tipo de coloração nas fotos em detalhe**

A colônia foi trazida para o Brasil no século XIX para o Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde recebeu o nome de *flor-da-redenção* e *bastão-do-imperador*, o qual, segundo se admite, deve-se ao fato de terem sido usadas as flores dessa

planta para presentear a princesa Isabel, logo após ter assinado a Lei Áurea, em 13 de maio de 1888 (CAMARGO, 2008).

É cultivada como planta ornamental devido à fragrância de suas flores e folhas e empregada em rituais religiosos afro-brasileiros (CAMARGO, 2008).

Atualmente é empregada na medicina popular ao redor do mundo, devido as suas propriedades antiinflamatórias, bacteriostáticas e fungicidas (ZOGHBI *et al.*, 1999; ITOKAWA *et al.*, 1981a; ITOKAWA *et al.*, 1981b; ITOKAWA *et al.*, 1987). O chá preparado com as folhas, flores ou raízes tem sido usado no tratamento caseiro da hipertensão (LORENZI; MATOS, 2002), sendo, também relacionada como espécie calmante (CAMARGO, 2008).

Segundo Almeida (1993), as propriedades medicinais da espécie estão relacionadas às folhas, flores e rizomas, sendo consideradas depurativas, diuréticas, anti-histéricas, estomáquicas e vermífugas. Existem relatos de atividade anti-helmíntica de *Alpinia sp* (SUZUKI *et al.*, 1996). É ainda, utilizada por lavradores da região de Ribeirão Preto (SP) no tratamento de reumatismo e males cardíacos (CARLINI, 1972).

A espécie tem sido largamente estudada em relação às suas propriedades farmacológicas. Os estudos com o chá das folhas da colônia realizado por Mendonça *et al.* (1991) e Laranja *et al.* (1992) confirmam o seu efeito hipotensor. Os estudos realizados por Fonteles e Oliveira (1984 *apud* ALMEIDA, 1993) revelaram resultados significativos quanto ao efeito diurético, entretanto, os mesmos não foram obtidos por Laranja *et al.* (1992). Santana *et al.* (1966) mostraram ação antiinflamatória capaz de inibir processos edematosos. A colônia tem sido também estudada em relação às atividades antifúngicas (LIMA *et al.*, 1993) e antibacterianas, além da produção de inseticidas a partir dos óleos essenciais da flor (MORITA, 1992). Foram isolados dos rizomas de *A. zerumbet* derivados de dehidrokawaina com atividade antiplaquetária (TENG *et al.*, 1990). Os compostos isolados dos rizomas de *A. zerumbet*, dihidro-5,6-dehidrokawaina, e 5,6-dehidrokawaina são os responsáveis pela atividade protetora da mucosa gástrica e duodenal em modelos de úlceras induzidas experimentalmente em roedores (HSU, 1987). A análise fitoquímica de *A. zerumbet*, através de cromatografia de camada delgada,

demonstrou a presença de taninos catéticos, fenóis e alcalóides, além de óleo essencial (MENDONÇA *et al.*, 1991). A composição química dos óleos essenciais encontrados na folha e no rizoma da espécie foi estudada por Fujita e Yamashita (1973) e por De Pooter *et al.* (1995). O óleo essencial extraído das folhas de colônia apresentou atividades relaxantes e antiespasmódicas no íleo de ratos (BEZERRA *et al.*, 2000). Essa atividade anti-espasmódica é provocada por moléculas de sesquiterpenos presentes nos extratos metanólicos dos rizomas e das folhas de *A. zerumbet* e *A. japonica*, como o  $\beta$ -eudesmol, nerolidol, epóxido de humulene II e 4 $\alpha$ -hidroxi-dihidroagarofurano (MORITA *et al.*, 1996). Elaawely *et al.* (2007a) observaram que existem três diferentes produtos (óleo essencial, dihidro-5,6-desidrokawáina (DDK) e compostos fenólicos) que podem ser obtidos das folhas e do rizoma da *A. zerumbet*. Os compostos fenólicos e o DDK apresentaram forte atividade antioxidante. Posteriormente, os mesmo autores isolaram óleo essencial, compostos fenólicos e DDK de flores e sementes de *A. zerumbet* e mostraram que esses compostos também apresentavam atividade antioxidante (ELAAWELY *et al.* 2007b).

A administração de extrato hidroalcolico de *A. zerumbet* produziu excitação psicomotora, contorções, hipocinese, além de prolongar o tempo de sono (Di STASI, 2002). Estudos toxicológicos (agudos e crônicos) com extratos etanólicos de *A. galanga* foram realizados e demonstradas mudanças intensas no ganho de peso e aumento da motilidade e contagem de espermatozoides (QURESHI *et al.*, 1992).

No nordeste brasileiro, bem como na região amazônica, o chá obtido por infusão da folha tem sido utilizado pelo efeito cardiovascular e hipotensor (Di STASI, 2002). Entre outros efeitos da medicina popular, verificam-se as propriedades calmante, antiasmática, diurética e anti-hipertensiva (MATOS, 1987). Seu emprego sob a forma de chá ou infusão é generalizado entre os cardíacos e hipertensos (MATOS, 1988). A posologia normal e popular é de 4g da folha para 250 mL de água fervida, no tratamento da hipertensão, da asma, dispnéias e hidrópsias (barriga d'água). Utiliza-se de 2-3 xícaras do chá por dia (MATOS, 1987).

Embora o uso da maioria das plantas medicinais não traga prejuízos aos usuários, o risco de intoxicação sempre existe, principalmente se não for utilizado de maneira correta. Daí a constante necessidade de avaliação das propriedades

atribuídas às plantas com vistas a sua confirmação ou invalidação, além do estabelecimento da toxicidade e as doses em que essa toxicidade se torna perigosa à saúde humana e de animais (MATOS, 1988). Com intuito de esclarecer os efeitos farmacológicos da planta e sugeri-la como possível fitoterápico, realizamos o teste de toxicidade aguda pela determinação da dose letal para 50% dos animais (DL<sub>50</sub>) do extrato aquoso bruto por via oral em camundongos, uma vez que esse conhecimento é exigido pela ANVISA para que o produto seja registrado como fitomedicamento. A ausência de dados toxicológicos e o uso popular generalizado do chá de colônia foram os motivos principais que motivaram a execução deste trabalho.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

- ✓ Estabelecer o perfil toxicológico do extrato aquoso liofilizado dissolvido em água destilada de *Alpinia zerumbet*.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar se o óleo essencial e o extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* são citotóxicos para HL-60, K-562, CEM, MDA-MB-435, MDA-MB-231, HCT-8, PC-3, SF-295 e B16;
- ✓ Determinar se o óleo essencial e o extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* são hemolíticos;
- ✓ Determinar a DL<sub>50</sub> do extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* dissolvido em água destilada;
- ✓ Determinar se o óleo essencial e o extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* têm ações genotóxicas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Equipamentos

- ✓ Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2<sup>®</sup>.
- ✓ Agitador de tubo, Donner AD 8850<sup>®</sup>.
- ✓ Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin<sup>®</sup>.
- ✓ Deionizador de água Milli-Q, Milipore<sup>®</sup>.
- ✓ Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter<sup>®</sup>.
- ✓ Incubadora de células, (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRETS Autoflow<sup>®</sup>.
- ✓ Fluxo laminar, VECO<sup>®</sup>.
- ✓ High Throughput Screening (HTS)/ Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter<sup>®</sup>.
- ✓ Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070<sup>®</sup>.
- ✓ Microondas, Panasonic<sup>®</sup>.

- ✓ Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/ PZO-Labimex Modelo Studar lab<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio de fluorescência.
- ✓ Micrótomo, SLEE Mainz<sup>®</sup>.
- ✓ PHmetro, Micronal B474<sup>®</sup>.
- ✓ Pipetas automáticas, Gilson<sup>®</sup>.
- ✓ Sistema de Eletroforese Horizontak mini Submarine, Amershan Bioscience<sup>®</sup>.

### 3.1.2 Soluções

- ✓ Agarose 1%
  - 0,5g de agarose (FMC-Bioproducts<sup>®</sup>)
  - Água deionizada q.s.p. 50mL
- ✓ Agarose LMP 1,5%
  - 1,5g de agarose (Gibco<sup>®</sup>)
  - PBS q.s.p 100mL
- ✓ Agarose NMP 0,5% (Gibco<sup>®</sup>)
  - 0,5g de agarose (Gibco<sup>®</sup>)
  - PBS q.s.p 100mL
- ✓ Azul de Tripán 10% (Vetec<sup>®</sup>)
  - 10mg de azul de tripan
  - PBS q.s.p. 100mL de solução

- ✓ Brometo de Etídio 100µg/mL(Sigma<sup>®</sup>)
  - 1mg de brometo de etídio
  - PBS q.s.p. 10mL de solução
  
- ✓ Eosina 0,5% (Doles<sup>®</sup>)
  - 0,5g de Eosina (Doles<sup>®</sup>)
  - 80mL de álcool etílico
  - 0,5mL de ácido acético
  - Água deionizada q.s.p 20mL
  
- ✓ Formaldeído 10% (Dinâmica<sup>®</sup>)
  - 100mL de formaldeído (Dinâmica<sup>®</sup>)
  - Água deionizada q.s.p. 1L
  
- ✓ Hematoxilina 0,1% (Doles<sup>®</sup>)
  - 0,5g de hematoxilina (Doles<sup>®</sup>)
  - 10mL de Glicerina (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 25g de sulfato de alumínio (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 0,1g de iodeto de potássio (Labsynth<sup>®</sup>)
  - Água destilada q.s.p. 500mL solução
  
- ✓ MTT (Sigma<sup>®</sup>)
  - 20mg de MTT (Sigma<sup>®</sup>)
  - PBS q.s.p. 100mL solução
  
- ✓ Solução fisiológica Ringer-lactato (Laboratórios Biosintética<sup>®</sup>)

- ✓ Solução de eletroforese
  - EDTA 1mM, NaOH 300mM pH>13
  
- ✓ Solução de lise
  - NaCl 2,5M
  - EDTA 100mM
  - Tampão tris 10mM
  - N-Lauroylsarcosine 1% pH10
  - Triton X-100 1%
  - DMSO 10%
  
- ✓ Solução de neutralização
  - Tampão tris 0,4M pH 7,5
  
- ✓ Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab<sup>®</sup>)
  
- ✓ Solução salina (para hemólise)
  - 8,5g Cloreto de sódio (0,85%) (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 1,11g Cloreto de Cálcio (10mM) (Reagen<sup>®</sup>)
  - Água destilada q.s.p. 1L solução
  
- ✓ Tampão de corrida 50 X (TAE)
  - 242g Tris
  - 57,1mL ácido acético glacial
  - 100mL EDTA 0,5M
  
- ✓ Tampão fosfato de sódio (PBS)

- 8,766g cloreto de sódio (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 2,14g NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 0,276g NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Labsynth<sup>®</sup>)
  - Água destilada q.s.p. 1L solução (pH 7,2)
- ✓ Tampão Tris (TBS) 10 X
- Cloreto de sódio 1,5M (Labsynth<sup>®</sup>)
  - Tris 0,5M pH 7,6
  - Água destilada q.s.p.
- ✓ Tripsina 0,25%
- 50mL de tripsina 2,5% (Cultilab<sup>®</sup>)
  - 0,125g EDTA (Proquímios<sup>®</sup>)
  - 450mL PBS
- ✓ Xilol 10%
- 100mL formaldeído
  - Água destilada q.s.p. 1L

### 3.1.3 Reagentes e Fármacos

- ✓ Ácido acético glacial (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Ácido clorídrico (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Álcool etílico (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Corante de Leishman (Cinética<sup>®</sup>)
- ✓ Cloreto de cálcio (Labsynth<sup>®</sup>)

- ✓ Cloreto de sódio (Labsynth<sup>®</sup>)
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Doxorrubicina-fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ EDTA (Qeel<sup>®</sup>)
- ✓ Estreptomicina 10mg/mL (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Ficoll (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Fitohemaglutinina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Hidróxido de sódio (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Meio de cultura de células RPMI 1640 (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ N-Lauroilsarcosina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Penicilina-estreptomicina (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Penicilina 10.000 U.I./mL (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Resazurina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Triton X-100 (Isofar<sup>®</sup>)

#### 3.1.4 Modelos Biológicos

- ✓ Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*.

Este projeto, com o nº 77/08, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará e conduzido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os animais, camundongos *Swiss* (*Mus musculus*), machos e fêmeas, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, com cerca de 3 semanas de idade e pesando cerca de 18g. Foram acondicionados em caixas de polipropileno autoclaváveis, 303 x 193 x 126 mm, com tampa grade em aço. Os

animais receberam água da rede pública (filtrada) *ad libitum* e foram alimentados com ração comercial (em todas as idades) fornecida também *ad libitum*, que atende as recomendações do National Research Council e National Institute of Health - Estados Unidos. A temperatura do ambiente foi mantida constante, cerca de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro.

- ✓ Linhagens Celulares tumorais mantidas em cultura (Tabela 1).
- ✓ Linfócitos murinos isolados de camundongos saudáveis.

### **3.2 Preparação do óleo essencial e do extrato aquoso liofilizado utilizado no tratamento**

Folhas frescas de *A. zerumbet* foram coletadas no sítio Vila Nova, localizado no distrito de Ladeira Grande, no município de Maranguape. A exata localização encontra-se a  $3^\circ 59' 26.49''$  de latitude sul e a  $38^\circ 42' 59.10''$  de longitude oeste. A identificação botânica da planta encontra-se no Herbário Prisco Bezerra-EAC da Universidade Federal do Ceará sob o número 41.041.

Os constituintes de um óleo essencial em particular podem ser separados por: destilação fracionada a pressão reduzida, cristalização ou cromatografia.

O óleo essencial foi isolado através da técnica do arraste de vapor. A técnica de extração pelo arraste de vapor permite a separação de componentes voláteis, sem necessidade de temperaturas elevadas, evitando-se assim, a sua decomposição térmica. Em laboratório, a técnica é realizada por meio de um sistema de destilação simples, adaptado com um funil de adição, através do qual água é adicionada constantemente, permitindo assim, que o nível da água no frasco de destilação permaneça constante (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2008).

O extrato aquoso de *A. zerumbet* foi preparado a partir de 1,5 g de folhas frescas, previamente cortadas, pesadas e empacotadas em sacos apropriados para produção de chá. Cada saco foi imerso em 200 mL de água destilada em ebulição e mantido abafado por 5 minutos. O chá produzido foi liofilizado no mesmo dia para a realização dos testes.

### **3.3 Ensaio de citotoxicidade pelo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazolim brometo)**

A citotoxicidade foi avaliada através do método do MTT (MOSMANN,1983), o qual vem sendo utilizado no programa de “screening” do “National Câncer Institute-NCI” dos Estados Unidos, que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup> para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, seguido da observação de crescimento celular com o auxílio do microscópio de inversão a cada 24h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo em uma concentração de 0,5-1,0x10<sup>6</sup> células/mL.

As células em suspensão foram plaqueadas em placas de 96 poços. Cada placa foi incubada em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Em seguida, foi adicionado o extrato aquoso de *A. zerumbet* (100 µL/poço) dissolvido em água destilada, na concentração de 0,0075 g/mL. A adição do óleo essencial foi realizada nas mesmas condições que o extrato aquoso, porém o óleo foi usado na concentração de 100%. O quimioterápico doxorubicina foi usado como controle positivo. Após o período de incubação de 72h as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 minutos. O sobrenadante foi aspirado, e adicionado 200 µg/mL de solução de MTT 10% em meio RPMI 1640. A placa foi colocada na estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 3 horas. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 3000 rpm/10 minutos. O sobrenadante foi aspirado. O precipitado foi ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por 5-10 minutos, até a completa

dissolução dos cristais de formazan. A placa foi lida no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

### 3.2.1 Análise dos dados

O óleo essencial e o extrato aquoso foram testados em diluições seriadas e em triplicatas. Suas  $IC_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software).

Tabela 1 - Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo Histológico do Câncer/ Origem</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (células/mL)</b>
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
<b>K-562</b>	Leucemia mielocítica crônica humana	$0,3 \times 10^6$
<b>CEM</b>	Leucemia linfocítica humana	$0,5 \times 10^6$
<b>MDA-MB 435</b>	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$
<b>MDA-MB 231</b>	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$
<b>HCT-8</b>	Carcinoma de cólon humano	$0,7 \times 10^5$
<b>PC-3</b>	Carcinoma de próstata humano	$0,1 \times 10^6$
<b>SF-295</b>	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$
<b>B16</b>	Melanoma murino	$0,6 \times 10^5$

### 3.3 Ensaio de citotoxicidade pelo “Alamar blue”

A técnica do “Alamar Blue” faz uso de um indicador de oxido-redução (redox), o “Alamar Blue” ou resazurina (azul e não fluorescente) que é reduzido por células viáveis a resorufina (róseo e altamente fluorescente) que pode ser reduzida a hidrorresorufina (incolor e não fluorescente). No ensaio do “Alamar blue” é quantificado apenas a redução da resazurina a resorufina. De acordo com diversos autores (NAKAYAMA *et al.*, 1997; ZHI-JUN *et al.*, 1997; HAMID *et al.*, 2004), o “Alamar Blue” não é tóxico para linfócitos e outros trabalhos têm comparado a sensibilidade deste ensaio com outros métodos de avaliação da proliferação celular e citotoxicidade, sendo relatado uma maior sensibilidade do “Alamar Blue” (PAGÉ *et*

*al.*, 1993; ANSAR AHMED *et al.*, 1994; De FRIES; MITSUHASHI, 1995; NAKAYAMA *et al.*, 1997).

O extrato aquoso liofilizado dissolvido em água na concentração de 1mg/mL (solução-estoque) e o óleo essencial usado na concentração de 100% (solução-estoque) foram testados em células mononucleares periféricas do sangue de camundongos (PBMC) durante 72h de exposição. Sangue heparinizado foi coletado de animais saudáveis (com idade entre 3-5 semanas) e as PBMC foram isoladas segundo gradiente de centrifugação de Ficoll-Hypaque. Após o isolamento as PBMC foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL, 100 µg/mL de estreptomicina e 4% de fitohemaglutinina. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL. Cada placa foi incubada em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Em seguida, foi adicionado o extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet* (100 µL/poço) dissolvido em água destilada, na concentração de 1 mg/mL. A adição do óleo essencial foi realizada nas mesmas condições que o extrato aquoso, porém o óleo foi usado na concentração de 100% inicialmente. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Com 24h antes do fim do período de incubação, 10 µL de solução-estoque (0,312 mg/mL) de “Alamar Blue” (resazurina, Sigma-Aldrich Co) foi adicionada a cada poço. A absorbância foi determinada nos comprimentos de onda de 570nm (estado oxidado) e 595nm (estado reduzido), utilizando um leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter). A percentagem de “Alamar Blue” reduzido foi calculada segundo a fórmula: % reduzido =  $A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \times 100$ .

Onde:  $A_{LW}$  = representa a leitura do estado reduzido.

$A_{HW}$  = representa a leitura do estado oxidado

$R_O$  = representa a divisão  $AO_{LW} / AO_{HW}$ .

$AO_{LW}$  = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com “Alamar Blue” em baixo comprimento de onda.

$AO_{HW}$  = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com “Alamar Blue” em alto comprimento de onda.

### 3.3.1 Análise Estatística do “Alamar Blue”

Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 5*.

### 3.4 Teste de hemólise

Esta metodologia, segundo Costa-Lotufu *et al.* (2002), permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática das células, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

O sangue foi coletado de três camundongos *Swiss (Mus musculus)* pela via do plexo orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10 mM) para a redução da contaminação plasmática e ressuspendidos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da primeira coluna recebeu 100  $\mu$ L da solução salina. Na segunda coluna, os poços receberam 50  $\mu$ L da solução salina e 50  $\mu$ L do veículo de diluição do extrato aquoso liofilizado e do óleo essencial, neste caso, água e DMSO respectivamente. Aos poços da terceira coluna, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução salina e 100  $\mu$ L do extrato aquoso liofilizado dissolvido em água ou do óleo essencial, nas concentrações iniciais de 0,375 mg/mL. Da quarta coluna em diante, os poços receberam 100  $\mu$ L da solução salina, excetuando-se os da última coluna, que receberam 80  $\mu$ L de solução salina e 20  $\mu$ L de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da terceira à décima primeira cavidade, retirando-se 100  $\mu$ L da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte, de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade. Em seguida, 100  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos foram adicionados a todos os poços. Após incubação de 1h, sob agitação constante à temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

### 3.5 Toxicidade aguda

Os animais foram pesados (peso variando entre 21g e 30g), codificados e separados aleatoriamente em cinco grupos, A, B, C, D e E. A dose a ser administrada foi calculada e preparada individualmente. O grupo A recebeu extrato aquoso na dose de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo do animal; o grupo B recebeu a dose de 2.750 mg/Kg de peso corpóreo do animal; o grupo C recebeu dose de 3.500 mg/Kg do peso corpóreo do animal; o grupo D recebeu dose de 4.250 mg/Kg de peso corpóreo do animal e o grupo E recebeu a dose de 5.000 mg/Kg de peso corpóreo do animal. Cada grupo foi formado por 5 machos e 5 fêmeas, mantidos em caixas separadas, para evitar que eles se reproduzissem.

O extrato aquoso foi pesado de acordo com cada animal e diluído em água destilada no dia da administração ao animal, para reproduzir ao máximo a característica do chá tomado popularmente.

Os animais foram mantidos em jejum de 4h antes da administração do extrato aquoso e cada um recebeu sua dose por via oral, ou seja, gavagem. Os possíveis efeitos decorrentes da ingestão do extrato aquoso liofilizado da colônia foram observados por 60 minutos e nas 24 h após a administração inicial. Os animais foram pesados novamente semanalmente até completar os 14 dias de experimento, quando foram sacrificados para avaliação macroscópica e retirada dos órgãos internos para avaliação microscópica.

Após esse teste, avaliou-se a toxicidade do extrato aquoso pelo método de Miller e Tainter (1944) determinando-se a  $DL_{50}$  (dose média que mata 50% dos animais). Através desse método, calculou-se a percentagem de morte, para cada grupo, que é transformada em probitos segundo uma tabela (CARLINE, 1973) e aplicada na ordenada, enquanto o logaritmo da dose ( $\text{Log}_{\text{dose}}$ ) do extrato aquoso liofilizado dissolvido em água fica plotado na abscissa. Dessa forma, determinou-se a  $DL_{50}$  através dos dados obtidos no gráfico.

A  $DL_{50}$  do óleo essencial foi previamente estabelecida por Calixto (dados não publicados).

### 3.6 Ensaio do cometa

Os animais foram pesados (peso variando entre 25 e 30g), codificados e separados em 5 grupos: A, B, C, D e E. O grupo A recebeu o extrato aquoso de *A. zerumbet* na dose de 2.000 mg/Kg de peso corpóreo do animal. O grupo B recebeu o extrato aquoso de *A. zerumbet* na dose de 3.500 mg/Kg de peso corpóreo do animal. O grupo C recebeu o extrato aquoso de *A. zerumbet* na dose de 5.000 mg/Kg de peso corpóreo do animal. O grupo D recebeu ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0) na dose de 25 mg/Kg. O grupo E recebeu solução salina 0,9%. Todas as doses foram administradas e, apenas 24h e 48 h após a administração, os animais tiveram seu sangue coletado para realização do teste.

Em um segundo experimento, outro grupo de animais foi pesado (peso variando entre 25 e 30g), codificados e separados em 4 grupos: A, B, C e D. O Grupo A recebeu solução salina 0,9%. O grupo B recebeu óleo essencial na dose de 400 mg/Kg de peso corpóreo do animal. Os grupos C e D receberam ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0) na dose de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg respectivamente. Todas as doses foram administradas e, apenas 24h e 48h após a administração, os animais tiveram seu sangue coletado para realização do ensaio.

O sangue coletado em tubos plásticos heparinizados foi diluído com agarose LMP e colocado em uma lâmina previamente coberta com uma película de agarose NMP. As lâminas foram mantidas na solução de lise por cerca de 2h e, em seguida, foi realizada a eletroforese. Após a corrida, as lâminas foram fixadas em álcool 100%, coradas com brometo de etídio 10% e contadas no microscópio de fluorescência.

### 3.7 Ensaio do micronúcleo

Cada animal foi pesado e separado aleatoriamente em cinco grupos, A, B, C, D e E, correspondente a uma dose do chá de *A. zerumbet*, um controle positivo e um controle negativo. Cada um desses grupos foi subdividido em dois, sendo um para avaliar em 24h e o outro em 48h. Cada grupo avaliado continha 5 animais machos e 5 animais fêmeas, devidamente identificados.

A dose do extrato aquoso de *A. zerumbet* administrado em dose única para o grupo A foi de 2.000 mg/Kg. A dose administrada em dose única para o grupo B foi de 3.500 mg/Kg e a dose única administrada para o grupo C foi de 5.000 mg/Kg. Após a administração por gavagem, os animais foram sacrificados após 24h e 48h. O grupo de controle negativo recebeu apenas solução de cloreto de sódio 0,9%. O grupo controle positivo recebeu ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0) na dose de 25 mg/Kg.

Em um segundo experimento, outro grupo de animais foi pesado (peso variando entre 25 e 30g), codificados e separados em 4 grupos: A, B, C e D. O Grupo A recebeu solução salina 0,9%. O grupo B recebeu óleo essencial na dose de 400 mg/Kg de peso corpóreo do animal. O grupo C e D receberam ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0) na dose de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg respectivamente. Todas as doses foram administradas e, apenas 24h e 48h após a administração, os animais foram sacrificados.

Os animais sacrificados com 24 e 48h tiveram suas patas traseiras limpas com álcool 70%. A pele foi cortada e o fêmur, exposto e retirado de forma íntegra. A extremidade final do fêmur foi cortada para expor o canal medular. A agulha de uma seringa de 1mL, previamente preenchida com SFB, foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando-se o SFB, de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo falcon previamente marcado com o código do animal. A seringa foi limpa com SFB e reutilizada para os animais do mesmo grupo.

O material da medula óssea foi ressuspendido em SFB e homogeneizado. A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 0,5mL de SFB.

Duas gotas da suspensão homogênea foram pingadas em uma lâmina, previamente identificadas com o código do animal, e realizado um esfregaço. As lâminas foram secas ao ar, na temperatura ambiente. Foram preparadas três lâminas de cada animal.

Após secas, as lâminas foram colocadas em cubas de coloração contendo corante de Leishman puro e coradas por 3 minutos. Após esse tempo, foram

transferidas para outra cuba contendo o corante de Leishman diluído em água destilada na proporção de 1:6, onde permaneceram corando durante 15 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas com água corrente e, em seguida, com água destilada, para retirar o excesso do corante. Todas as lâminas foram secas ao ar, em temperatura ambiente, por 24h. A qualidade da coloração foi avaliada e as lâminas foram montadas e guardadas em caixas próprias.

As células foram contadas de forma diferencial, os eritrócitos normocromáticos (NCE) ou maduros (células rosadas) e os eritrócitos plicromáticos (EPC) ou jovens (células arroxeadas). Após essa contagem, foram contadas 1000 células EPC para detectar a ocorrência de micronúcleo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaio de citotoxicidade pelo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)

O extrato aquoso e o óleo essencial não se mostraram citotóxicos frente a células tumorais humanas e murinas pelo método do MTT, como observado pelos dados da tabela 2.

**Tabela 2 - Atividade citotóxica do extrato aquoso e do óleo essencial de *A. zerumbet* em células tumorais pelo MTT**

	<b>Extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i> (IC<sub>50</sub>)</b>	<b>Óleo essencial de <i>A.</i> <i>zerumbet</i> (IC<sub>50</sub>)</b>
<b>HL-60</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>K-562</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>CEM</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>MDA-MB 435</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>MDA-MB 231</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>HCT-8</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>PC-3</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>SF-295</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL
<b>B16</b>	> 5µg/mL	> 5µg/mL

### 4.2 Ensaio de citotoxicidade pelo alamar blue

O extrato aquoso e o óleo essencial não apresentaram ação citotóxica frente a células humanas normais, como os linfócitos, pelo método do alamar blue, que é mais sensível que o método do MTT, como observado pelos dados da tabela 3.

Tabela 3 - Atividade citotóxica do extrato aquoso e do óleo essencial de *A. zerumbet* em linfócitos normais pelo alamar blue

Substância	IC <sub>50</sub>
Extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i>	> 5µg/mL
Óleo essencial de <i>A. zerumbet</i>	19,76%

### 4.3 Teste de hemólise

Conforme observado pelos dados da tabela 4, o extrato aquoso e o óleo essencial não apresentaram atividade hemolítica frente a eritrócitos de camundongos.

Tabela 4 - Atividade hemolítica do extrato aquoso e do óleo essencial de *A. zerumbet* em eritrócitos de camundongo 2%

Substância	EC <sub>50</sub> (µL/mL)
Extrato aquoso de <i>A. zerumbet</i>	> 1000
Óleo essencial de <i>A. zerumbet</i>	> 1000

A hemólise total foi obtida com 50 µl de Triton X-100 1% e 1h de incubação. A EC<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95 % (IC 95%) foram obtidos por regressão não linear.

### 4.4 Toxicidade aguda

O extrato aquoso foi testado em cinco doses diferentes, entretanto nenhuma delas mostrou-se tóxica quando administrada unicamente. Os poucos efeitos causados pela administração da substância estão apresentados nas tabela 5 e 6.

**Tabela 5 - Efeito de doses orais únicas do extrato aquoso de *A. zerumbet* em camundongos machos**

<b>Dose (mg/Kg)</b>	<b>Sexo</b>	<b>M/T</b>	<b>Latência</b>	<b>Sintomas</b>
<b>2.000</b>	Machos	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
<b>2.750</b>	Machos	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
<b>3.500</b>	Machos	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
<b>4.250</b>	Machos	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
<b>5.000</b>	Machos	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.

Estudo de toxicidade aguda - doses orais (2.000-5.000mg/Kg). O extrato aquoso liofilizado dissolvido em água destilada (1mg/mL) foi administrado pela via oral por gavagem. Todos os camundongos tratados (n=10 em cada grupo; 5 machos, 5 fêmeas) foram cuidadosamente examinados durante 14 dias após a administração da dose para avaliar mudanças comportamentais, letalidade e a latência de morte. M/T=número de camundongos mortos/número de camundongos tratados. Latência=tempo de morte após administração da dose.

Tabela 6 - Efeito de doses orais únicas do extrato aquoso de *A. zerumbet* em camundongos fêmeas

Dose (mg/Kg)	Sexo	M/T	Latência	Sintomas
2.000	Fêmeas	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
2.750	Machos	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
3.500	Fêmeas	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
4.250	Fêmeas	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.
5.000	Fêmeas	0/5	-	Piloereção, fotofobia, redução de atividade.

Estudo de toxicidade aguda - doses orais (2.000-5.000mg/Kg). O extrato aquoso liofilizado dissolvido em água destilada (1mg/mL) foi administrado pela via oral por gavagem. Todos os camundongos tratados (n=10 em cada grupo; 5 machos, 5 fêmeas) foram cuidadosamente examinados durante 14 dias após a administração da dose para avaliar mudanças comportamentais, letalidade e a latência de morte. M/T=número de camundongos mortos/número de camundongos tratados. Latência=tempo de morte após administração da dose.

#### 4.5 Ensaio do cometa

O extrato aquoso de *A. zerumbet*, em todas as doses testadas, e o óleo essencial, na dose testada, não provocaram danos ao DNA celular do sangue dos camundongos, não havendo a formação do cometa. Nas amostras utilizadas como controle positivo, ciclofosfamida 25 mg/Kg e 50 mg/Kg, verificamos que de 100 células contadas em cada animal, a maioria recebeu escores 2, 3 e 4. Já as amostras do controle negativo apresentaram células cujos escores, em sua grande maioria foi zero, havendo apenas raros casos de escores tipo 1. Dessa forma, as análises estatísticas mostraram uma semelhança entre as doses testadas e controle negativo, com um  $P > 0,05$ ; em relação ao controle positivo, houve diferença

estatisticamente significativa, com um  $P < 0,001$ . Os resultados indicam que ambas as amostras não apresentam ação genotóxica.

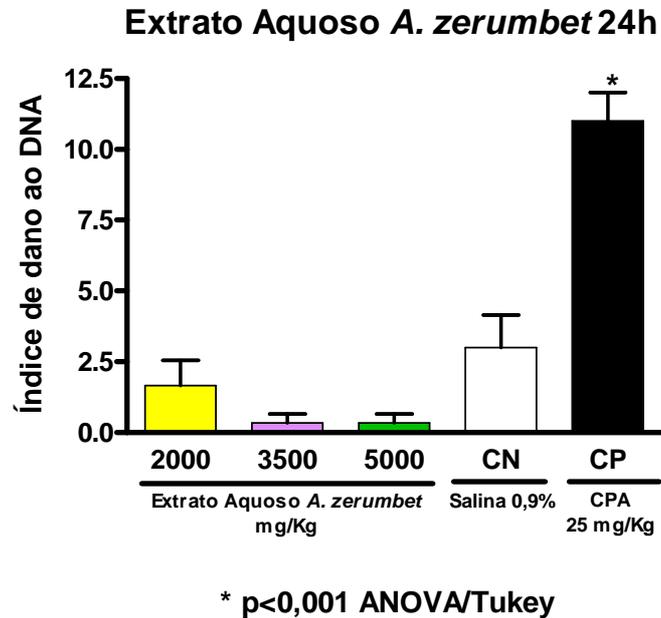


Figura 3 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do extrato aquoso de *A. zerumbet* após 24h de exposição em camundongos fêmeas

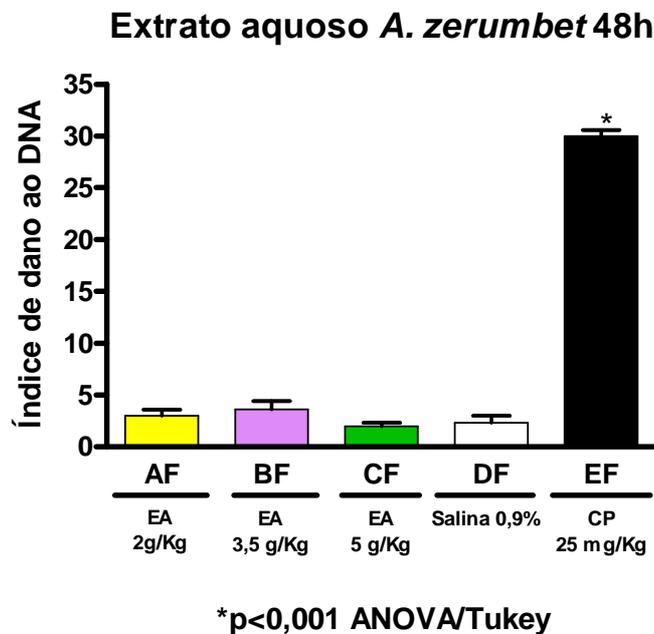
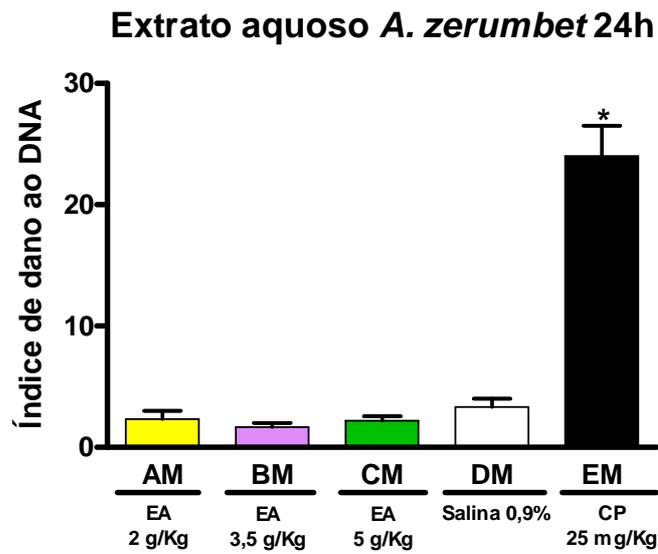
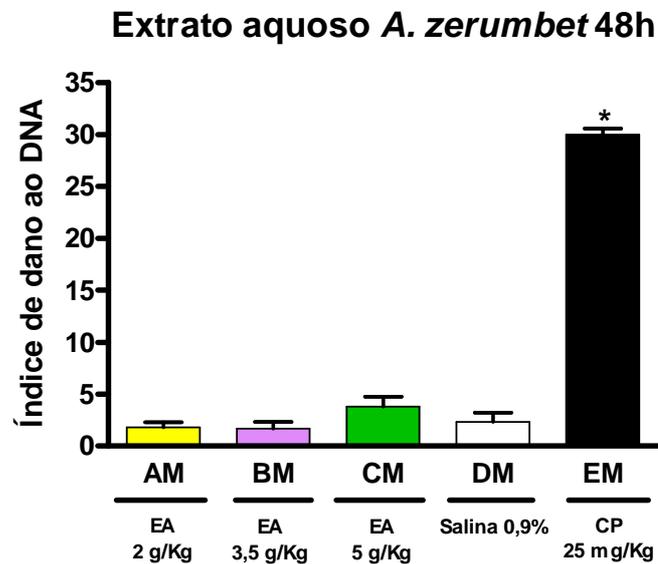


Figura 4 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do extrato aquoso de *A. zerumbet* após 48h de exposição em camundongos fêmeas



\* $p < 0,001$  ANOVA/Tukey

Figura 5 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do extrato aquoso de *A. zerumbet* após 24h de exposição em camundongos machos



\* $p < 0,001$  ANOVA/Tukey

Figura 6 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do extrato aquoso de *A. zerumbet* após 48h de exposição em camundongos machos

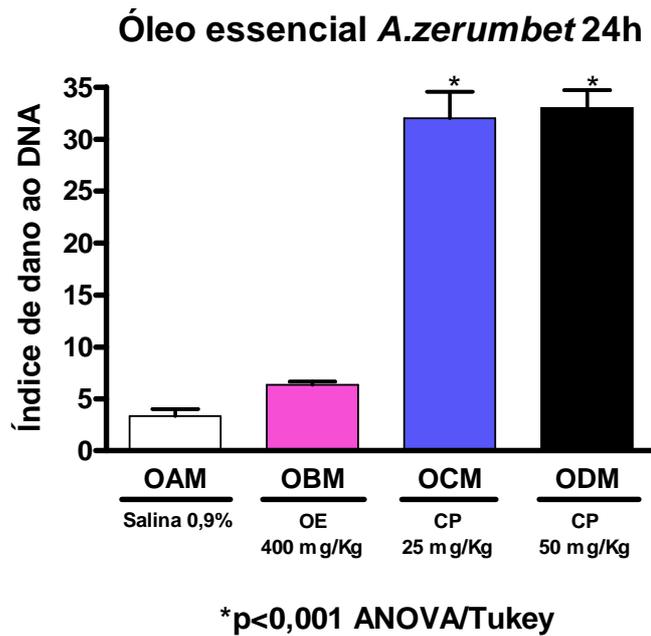


Figura 7 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do óleo essencial de *A. zerumbet* após 24h de exposição em camundongos fêmeas

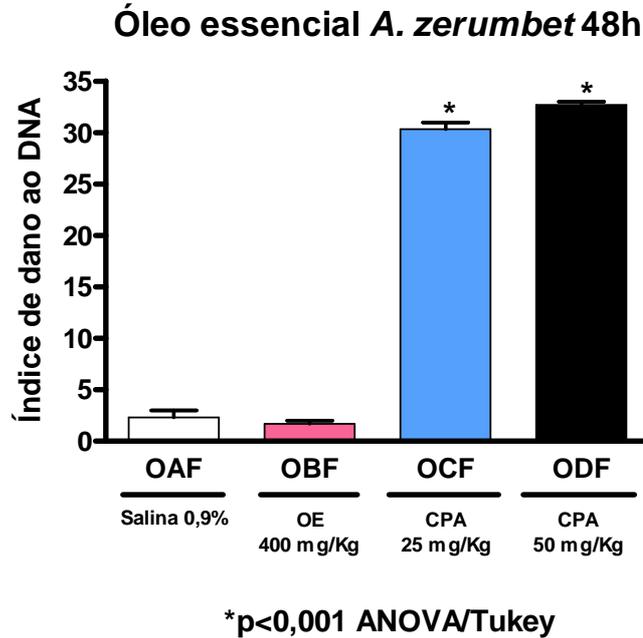


Figura 8 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do óleo essencial de *A. zerumbet* após 48h de exposição em camundongos fêmeas

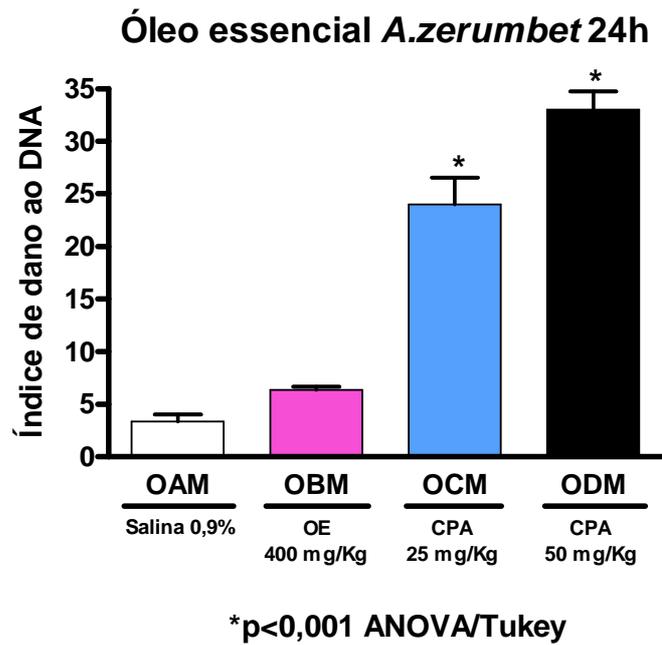


Figura 9 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do óleo essencial de *A. zerumbet* após 24h de exposição em camundongos machos

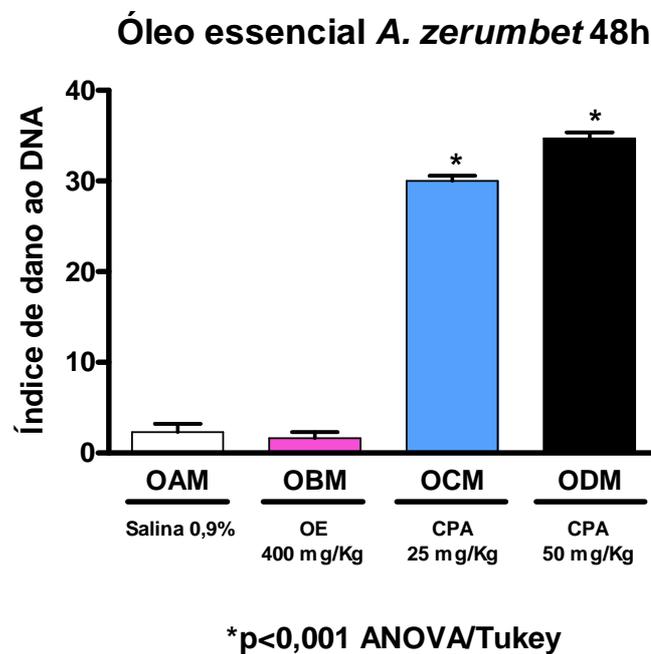


Figura 10 - Gráfico do ensaio do cometa *in vivo* do óleo essencial de *A. zerumbet* após 48h de exposição em camundongos machos

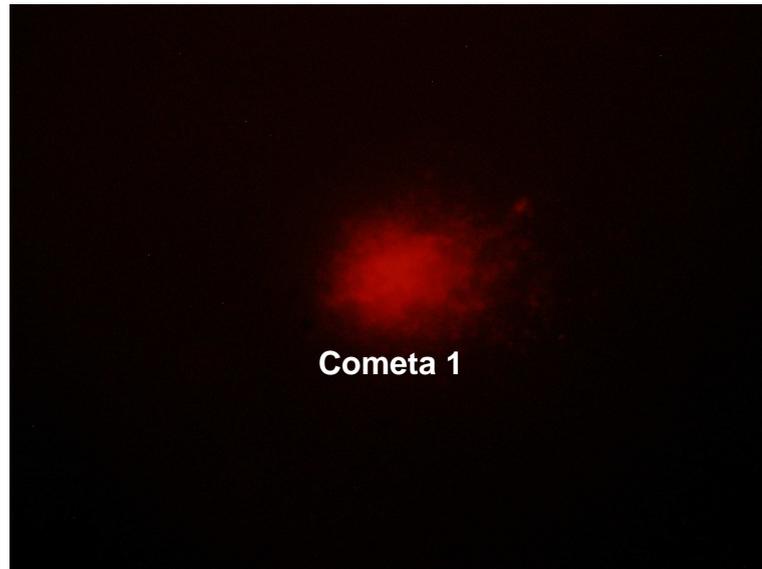


Figura 11 - Fotomicrografia de cometa do tipo 1

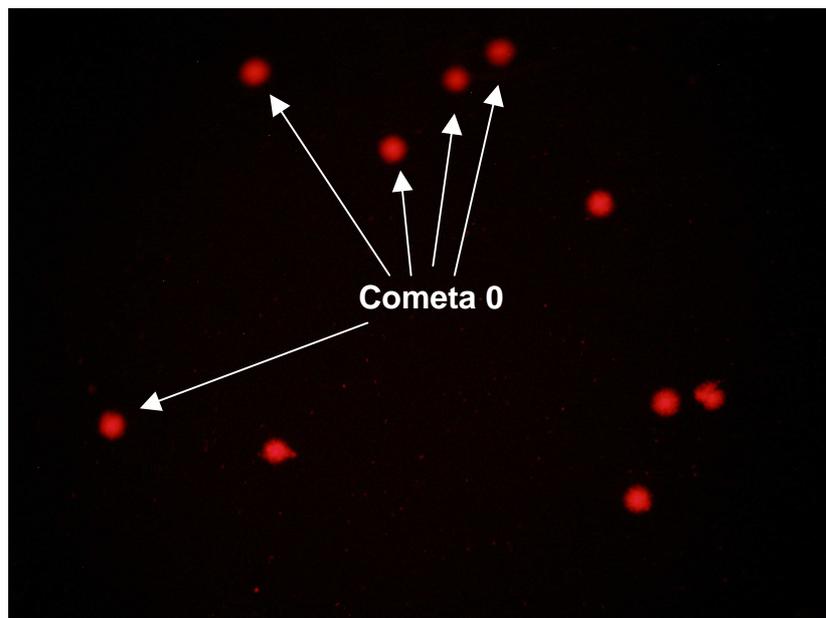


Figura 12 - Fotomicrografia do cometa, evidenciando vários cometas do tipo zero

#### 4.6 Ensaio do micronúcleo

Cerca de 1.000 eritrócitos policromáticos (EPC) foram contados e analisados por animal. No grupo de 24h de animais machos, foram observados 3 micronúcleos na dose de 2.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*, 3

micronúcleos na dose de 3.500 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet* e 2 micronúcleos na dose de 5.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*. No grupo de 48h de animais machos, foram observados 1 micronúcleo na dose de 2.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*, 2 micronúcleos na dose de 3.500 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet* e 2 micronúcleos na dose de 5.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*. No grupo de 24h de animais fêmeas, foi observado 1 micronúcleo na dose de 2.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*, 2 micronúcleos na dose de 3.500 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet* e 2 micronúcleos na dose de 5.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*. No grupo de 48h de animais fêmeas, foram observados 1 micronúcleo na dose de 2.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*, 2 micronúcleos na dose de 3.500 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet* e 2 micronúcleos na dose de 5.000 mg/Kg do extrato aquoso liofilizado de *A. zerumbet*. Estes resultados foram estatisticamente diferentes do resultado da ciclofosfamida, mostrando que o extrato aquoso não apresenta efeito genotóxico.

Cerca de 1.000 eritrócitos policromáticos (EPC) foram contados e analisados por animal. No grupo de 24h de animais machos, foram observados 4 micronúcleos na dose de 400 mg/Kg do óleo essencial de *A. zerumbet*. No grupo de 48h de animais machos, foram observados 1 micronúcleo na dose de 400 mg/Kg do óleo essencial de *A. zerumbet*. No grupo de 24h de animais fêmeas, foram observados 3 micronúcleos na dose de 400 mg/Kg do óleo essencial de *A. zerumbet*. No grupo de 48h de animais fêmeas, foram observados 3 micronúcleos na dose de 400 mg/Kg do óleo essencial de *A. zerumbet*. Estes resultados foram estatisticamente diferentes do resultado da ciclofosfamida nas doses de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg, com um  $p < 0,001$ , evidenciando que o extrato aquoso não apresenta efeito genotóxico, o que corrobora com os resultados do ensaio do cometa. Os dados de ambas as amostras estão nas tabelas 6, 7 e 8.

A figura 11 mostra a fotomicrografia de um eritrócito policromático (EPC) encontrado em uma amostra testada. A figura 12 mostra a diferença de coloração de um eritrócito policromático (EPC) com um micronúcleo e de um eritrócito normocromático (ENC).

Tabela 7 - Tabela representativa dos resultados do ensaio do micronúcleo do extrato aquoso de *A. zerumbet*

Grupo	Tratamento (mg/kg)	Sexo	Tempo <sup>b</sup> (h)	Micronúcleos/1.000 EPC/animal					Média ± D.P.
				Dados individuais					
Salina	-		24	0	0	0	0	0	0,00
			48	0	0	0	0	0	0,00
CPA	25		24	9	7	4	4	7	6,2 ± 2,16
	25		48	3	5	10	11	8	7,40 ± 3,36
Extrato	2.000	M	24	2	0	0	1	0	0,60 ± 0,89*
			48	0	0	0	0	1	0,20 ± 0,44*
	3.500		24	2	0	0	1	0	0,60 ± 0,89*
			48	0	0	1	1	0	0,40 ± 0,54*
	5.000		24	0	0	0	1	1	0,40 ± 0,58*
			48	0	2	0	1	1	0,80 ± 0,83*
Salina	-		24	0	0	0	0	0	0,00
			48	0	0	0	0	0	0,00
CPA	25		24	4	11	8	6	8	7,40 ± 2,60
	25		48	5	8	5	7	4	5,80 ± 1,64
Extrato	2.000	F	24	0	0	0	0	1	0,20 ± 0,44*
			48	0	0	1	0	0	0,20 ± 0,44*
	3.500		24	0	0	0	2	0	0,40 ± 0,89*
			48	0	1	1	0	0	0,40 ± 0,54*
	5.000		24	0	0	1	1	1	0,60 ± 0,54*
			48	0	0	1	0	1	0,40 ± 0,54*

<sup>a</sup>Ciclofosfamida (CPA); <sup>b</sup>Tempo de sacrifício após o tratamento. \*p<0,001 comparado a ciclofosfamida por ANOVA seguido por Dunett.

**Tabela 8 - Tabela representativa dos resultados do ensaio do micronúcleo do óleo essencial de *A. zerumbet* nos animais sacrificados com 24h**

	EPCMN (24h)						24h
	n						Média ± D.P.
<b>Salina 0,9% (M)</b>	5	0	0	1	0	2	0,60 ± 0,89*
<b>Salina 0,9% (F)</b>	5	0	1	0	0	1	0,40 ± 0,54*
<b>OE 400 mg/Kg (M)</b>	5	1	1	0	1	1	0,8 ± 0,44*
<b>OE 400 mg/Kg (F)</b>	5	0	0	2	0	1	0,60 ± 0,89*
<b>CPA 25 mg/Kg (M)</b>	5	6	4	7	4	9	6,00 ± 2,12
<b>CPA 25 mg/Kg (F)</b>	5	7	7	9	5	7	7,00 ± 1,41
<b>CPA 50 mg/Kg (M)</b>	5	11	10	17	8	15	12,20 ± 3,70
<b>CPA 50 mg/Kg (F)</b>	5	12	15	9	13	11	12,00 ± 2,23

\*p<0,001 em relação a ciclofosfamida (25 e 50 mg/mg) comparado a ciclofosfamida por ANOVA seguido por Dunett.

**Tabela 9 - Tabela representativa dos resultados do ensaio do micronúcleo do óleo essencial de *A. zerumbet* nos animais sacrificados com 48h**

	EPCMN (48h)						48h
	n						
<b>Salina 0,9% (M)</b>	5	0	0	0	1	1	0,40 ± 0,54*
<b>Salina 0,9% (F)</b>	5	1	0	1	1	0	0,60 ± 0,54*
<b>OE 400 mg/Kg (M)</b>	5	0	0	0	1	0	0,20 ± 0,44*
<b>OE 400 mg/Kg (F)</b>	5	0	1	1	0	1	0,60 ± 0,54*
<b>CPA 25 mg/Kg (M)</b>	5	5	7	4	9	7	6,40 ± 1,94
<b>CPA 25 mg/Kg (F)</b>	5	3	8	5	2	4	4,40 ± 2,30
<b>CPA 50 mg/Kg (M)</b>	5	12	8	11	7	8	9,20 ± 2,16
<b>CPA 50 mg/Kg (F)</b>	5	6	10	5	9	9	7,80 ± 2,16

\*p<0,001 em relação a ciclofosfamida (25 e 50 mg/mg) comparado a ciclofosfamida por ANOVA seguido por Dunett

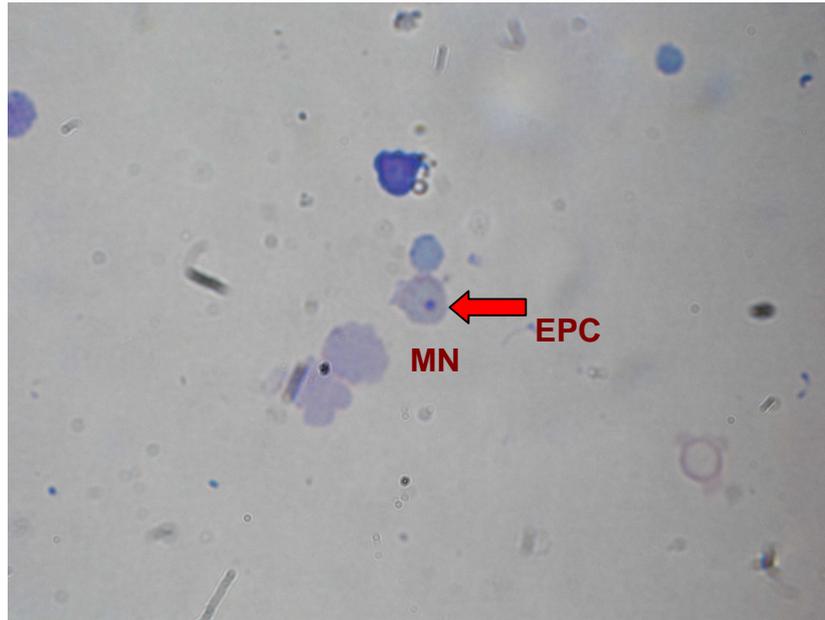


Figura 13 - Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos (PCE) apresentando micronúcleo

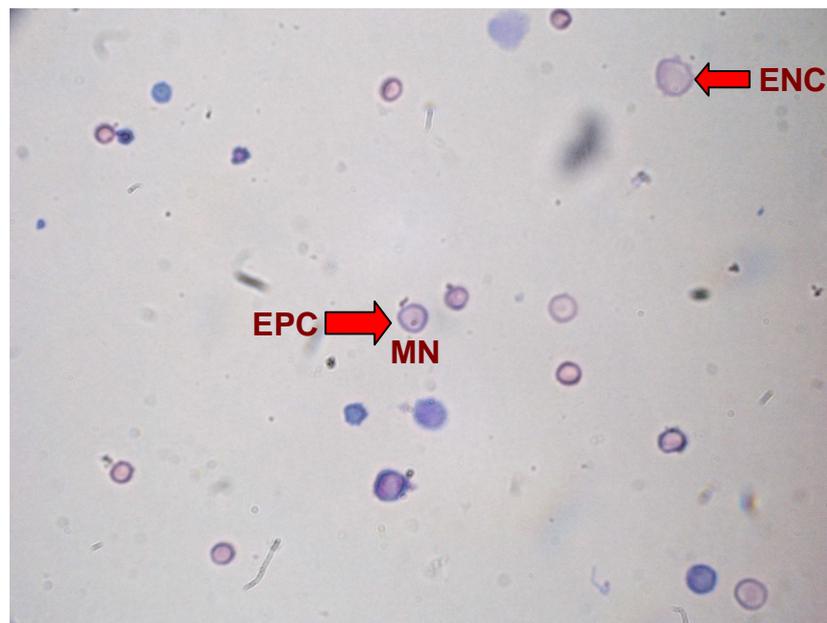


Figura 14 - Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos (EPC) apresentando micronúcleo e eritrócitos normocromáticos (NCE)

## 5 DISCUSSÃO

Desde o início da colonização brasileira, o interesse e a exploração dos produtos naturais originados de plantas têm sido despertados (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

De acordo com a 31<sup>a</sup> Assembléia da Organização Mundial de Saúde-OMS, planta medicinal é aquela que administrada ao homem ou a um animal, por qualquer via e sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica (MATOS, 1988).

A espécie *A. zerumbet*, conhecida popularmente como colônia no Nordeste brasileiro, é uma planta medicinal usada amplamente na medicina popular como chá ou infusões para o tratamento de doenças intestinais e cardiovasculares, como a hipertensão arterial (MENDONÇA *et al.*, 1991; PRUDENTE *et al.*, 1993; BEZERRA *et al.*, 2000).

Os testes de citotoxicidade com o óleo essencial e com o extrato aquoso de *A. zerumbet* foram realizados contra células tumorais de várias linhagens, variando entre as mais resistentes e as mais sensíveis, como em linfócitos normais de humanos. Todos os resultados obtidos foram negativos para uma possível ação citotóxica de alguns dos compostos testados. Esse resultado nos mostra que, apesar dos constituintes dessa planta apresentar uma série de atividades farmacológicas, descarta-se logo a possibilidade de que ela possua um composto antitumoral, embora outras espécies do mesmo gênero, como a *A. galanga* e *A. oxyphylla*, tenham tido substâncias isoladas com essa atividade farmacológica tão importante para aumentar a possibilidade de tratamentos de doenças com essa (Di STASI, 2002).

O extrato aquoso e o óleo essencial não apresentaram atividade hemolítica contra hemácias de camundongos, confirmando que são substâncias com baixo poder tóxico e tanto não desestabilizantes de membrana plasmática, o que torna seguro para ingestão humana, principalmente na forma popular como é utilizado.

No presente trabalho, foi avaliada a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *A. zerumbet* em modelo de camundongos, utilizando a legislação estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004).

Os fitoterápicos são, em sua grande maioria, produtos cuja venda independe de prescrição médica. A sua propaganda não necessita de autorização prévia do Ministério da Saúde, desde que observada a seguinte condição: “[...] que o texto, figura, imagem ou projeções não ensejem interpretação falsa, erro ou confusão quanto à composição do produto, suas finalidades, modo de usar ou procedência, ou apregoem propriedades terapêuticas não comprovadas por ocasião de registro a que se refere o item anterior” (BRASIL, 1977). O mesmo artigo estabelece ainda “[...] que sejam declaradas obrigatoriamente as contra-indicações, indicações, cuidados e advertências sobre o uso do produto [...]” (BRASIL, 1977). Entretanto, o que freqüentemente se observa são propagandas pouco criteriosas, contrariando frontalmente princípios estabelecidos na terapêutica e na legislação em vigor. No caso de plantas medicinais, é muito utilizado o mito de que produto natural não apresenta efeitos indesejáveis e contra-indicações. No entanto, é ou deveria ser do conhecimento geral que muitas plantas são potencialmente tóxicas, inclusive algumas utilizadas na terapêutica. Essas propagandas podem trazer retornos imediatos à indústria, entretanto, a longo prazo podem levar ao descrédito e ao desprestígio dos fitoterápicos e até mesmo inviabilizar a ampliação do seu uso como recurso terapêutico. (FARIAS *et al.*, 1985).

Como instrumento de orientação do consumidor, elas devem conter informações a respeito das indicações, contra-indicações, precauções, doses e modo de usar (BRASIL, 1984). Essas informações são extremamente importantes para a eficácia e segurança na utilização do medicamento. São necessários rigorosos critérios e responsabilidade na elaboração de uma bula. Entretanto, no comércio de fitoterápicos são comuns as bulas oportunistas e inescrupulosas, apresentando muitas vezes dezenas de propriedades farmacológicas, grande parte sem nenhum respaldo, observado em muitas bulas de fitoterápicos, o que configura uma infração ética, lesando os consumidores tanto no aspecto econômico como no de saúde (FARIAS *et al.*, 1985).

O teste da DL<sub>50</sub> foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *Digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. Para a realização do teste da DL<sub>50</sub>, eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada, normalmente ratos e camundongos, e para cada substância testada (KRYSIK; RYDZYNSKI, 1997; STAMMATI *et al.*, 2005; GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) incorporou o Teste da DL<sub>50</sub> em suas diretrizes. Entretanto, neste período foi amplamente aceito que precisão estatística juntamente com dados como a inclinação da curva dose-resposta, intervalo de confiança da DL<sub>50</sub>, e sinais tóxicos, não seriam necessários para propostas de avaliação de risco. Diante disso, a diretriz de 1981 para toxicidade aguda oral (OECD, 401) estabeleceu o uso de apenas 5 animais por sexo, por dose, por grupo, com 3 grupos de doses por teste, sendo estas doses escolhidas a partir de estudos prévios ou dados históricos, para estimar o valor da DL<sub>50</sub>. Uma dose limite superior de 5.000 mg/kg foi também introduzida para substâncias consideradas atóxicas. Neste documento, o conceito de dose teste limite foi introduzido, o qual exigia, para substâncias com DL<sub>50</sub> superior a 5.000 mg/kg, que somente a dose limite superior seria testada. Outras diretrizes também foram publicadas para a avaliação da toxicidade dérmica (OECD 402) e avaliação da toxicidade inalatória aguda (OECD 403).

Em 1987, a diretriz 401 da OECD foi revisada essencialmente no que diz respeito às questões referentes ao bem-estar animal. Como consequência, os testes passariam a ser conduzidos, utilizando apenas um sexo, com uma posterior confirmação de que não existiam diferenças no material testado na toxicidade aguda oral testando apenas uma dose no segundo sexo. Isto reduziu o número de animais

necessários de 30 para 20. Além disso, a dose limite, que antes era de 5.000 mg/kg, foi reduzida para 2.000 mg/kg.

Em 1984, Iain Purchase articulou a criação de um grupo de trabalho na Sociedade Britânica de Toxicologia. Este grupo propôs um novo método para a avaliação da toxicidade aguda oral, o qual evitava utilizar o critério morte dos animais como o objetivo final e propôs a observação do aparecimento de sinais claros de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas. Este método ficou conhecido como o Teste da Dose Fixa (TDF), avaliado por agências Internacionais, sendo posteriormente publicado em 1990 (VAN DENHEUVEL *et al.*, 1990). Este trabalho demonstrava que o TDF permitia classificar substâncias de forma compatível com o sistema empregado pela União Européia, o qual qualificava pelos valores de  $DL_{50}$  oriundos do teste clássico de toxicidade oral aguda. O TDF também fornecia a informação necessária sobre a natureza, tempo de início, duração e desfecho dos sinais de toxicidade, os quais são necessários para a avaliação de risco. Mais ainda, o TDF utilizava um número menor de animais do que aquele preconizado pela OECD 401; causava menor mortalidade associada ao composto teste; além de menor dor e sofrimento aos animais.

Em 1992, o TDF foi adotado pela OECD (OECD 420) como alternativa a OECD 401 e não, ainda, como uma substituição. Em 1996, surgiu uma segunda alternativa a OECD 401, o método da Toxicidade Aguda de Classe (TAC) o qual foi adotado pela OECD (OECD 423) e, em 1998, surgiu o Teste “*Up and Down*” (TUD) sendo, também, posteriormente recomendado pela OECD (OECD 425). O Teste TAC também utiliza o conceito de dose fixas, porém o objetivo final seria a mortalidade. O TUD, como o nome sugere objetiva estimar o valor da  $DL_{50}$  testando seqüencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior.

Contudo, o uso na prática destes três métodos alternativos não foi amplamente absorvido pela sociedade científica. Em países como o EUA e Japão, embora incorporadas as diretrizes e recomendadas, o uso destes métodos ficaram restritos a aquelas substâncias onde não era obrigado a obtenção do valor da  $DL_{50}$ , o intervalo de confiança e a inclinação da curva. Além disso, no caso dos pesticidas, a legislação vigente ainda solicitava a dose limite de 5.000 mg/kg enquanto que a

dose limite recomendada pelos três métodos era de 2.000 mg/kg (VALADARES, 2006).

Durante a década de noventa, de forma controversa, mesmo com a adição dos métodos alternativos de avaliação de toxicidade, muitos laboratórios ainda usavam a versão da OECD 1981, a OECD 401. Isto aconteceu principalmente pela obrigatoriedade de utilizar a dose limite superior de 5.000 mg/kg, usada para confirmar a ausência de diferença entre os sexos na suscetibilidade à substância teste, além do desconhecimento dos novos métodos (BOTHAM, 2004).

Neste contexto, para facilitar a aceitação internacional dos três métodos e iniciar o processo de eliminação definitiva da diretriz OECD 401, a OECD organizou uma série de reuniões com especialistas no período de 1998 e 2000, o qual resultou na revisão das diretrizes 420, 423 e 425, além de um documento para o uso e interpretação de métodos alternativos de avaliação de toxicidade (VALADARES, 2006).

Desde 2000, o grupo de trabalho da OECD para químicos, pesticidas e produtos biotecnológicos concluiu que a OECD 401 seria banida e as diretrizes 420, 423 e 425, então revisadas, foram definitivamente adotadas e recomendadas. Em dezembro de 2002, em associação com a ICCVAM (*Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods*) e US-EPA (*United States-Environmental Protection Agency*), o teste da DL<sub>50</sub> foi finalmente banido.

Entretanto, no Brasil, a agência reguladora desse tipo de teste, a ANVISA estabelece suas diretrizes para aceitar os dados de um estudo feito com um potencial fitoterápico em sua página na internet (BRASIL, 2004). Apesar de todas as novas resoluções internacionais lidas, estudadas e preconizadas, as diretrizes legislativas regidas pela ANVISA foram as seguidas, com o objetivo de estabelecer todas as características toxicológicas do fitoterápico estudado dentro das leis de nosso país.

Foram escolhidas três doses: 2.000 mg/Kg, 3.500 mg/Kg e 5.000 mg/Kg, administradas por via oral. Essas doses foram estabelecidas baseado no trabalho de Mendonça *et al.* (1991). Neste trabalho, o autor estabeleceu a DL<sub>50</sub> do extrato hidroalcolico de *A. zerumbet* por via oral, que foi acima de 10.000 mg/Kg do peso

corpóreo do animal. Observamos que o chá apresenta baixíssima toxicidade, uma vez que a  $DL_{50}$  estabelecida foi um valor acima de 5.000 mg/Kg. Não podemos afirmar que o extrato aquoso é mais tóxico que o extrato hidroalcolico, pois a dose máxima testada no presente trabalho foi de 5.000 mg/Kg, enquanto que no trabalho realizado por Mendonça (1989), a maior dose testada foi de 18.000 mg/Kg. Não extrapolamos a dose de 5.000 mg/Kg em respeito às normas de boas práticas com animais de laboratório e também por que se tornaria inviável a diluição de tão grande quantidade em tão baixo volume para administrar ao animal. Entretanto, alguns efeitos comportamentais foram avaliados nos animais após a administração do chá em suas diversas doses testadas. Cerca de 7 minutos após a administração, a atividade geral dos animais foi bastante reduzida, permanecendo agrupados, sob a raspa de suas gaiolas, com os olhos fechados, indicando uma certa fotofobia. Entretanto, na literatura encontramos que o óleo essencial da colônia produziu depressão do sistema nervoso central, bloqueio neuromuscular, inibição da musculatura lisa, provavelmente por diminuição do influxo de íons cálcio durante a contração (Di STASI, 2002). Uma piloereção também foi observada em todos os animais que ingeriram o chá da colônia, porém essa reação pode ter alguma relação com alguns constituintes do óleo essencial que ainda estava presente na infusão. Esse efeito foi relatado por Mendonça (1989). Todos esses resultados comportamentais podem estar diretamente relacionado à presença de certa quantidade de óleo essencial no extrato aquoso, uma vez que não foi realizada nenhuma separação desses dois constituintes.

A maior parte dos óleos essenciais encontrados é constituído por terpenos, com traços de sesquiterpenos e diterpenos (MATOS, 1979). Por apresentar taninos catéquicos, fenóis livres e alcalóides, segundo Mendonça (1989), alguns desses comportamentos também podem ser explicados pela presença desses taninos. Os taninos podem produzir efeitos farmacológicos não específicos, como a depressão do sistema nervoso central, diminuição da pressão arterial sangüínea e antagonismo dos efeitos estimulatórios de vários agonistas do músculo liso intestinal e uterino (CALIXTO, 1982; TOKAHASNI, 1982).

O óleo essencial de *A. zerumbet* é rico em terpinen-4-ol, 1,8 cineol e metil-eugenol (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Esses três constituintes parecem ser os maiores responsáveis pelo efeito antinociceptivo observado por Araújo Pinho *et al.* (2005). Já

os efeitos de depressão do sistema nervoso central e sedação foram observados e relacionados à presença do constituinte terpinen-4-ol, que já foi previamente reportado por Moreira *et al.* (2001) como responsável por esses efeitos. O 1,8-cineol foi demonstrado agir por um mecanismo opióide (SANTOS; RAO, 2000), o que indica que o efeito observado de sedação pode também estar relacionado a esse constituinte do óleo essencial que está presente no extrato aquoso, mesmo que em baixas concentrações. Mpalantinos *et al.* (1998) isolou em seu trabalho flavonóides e kavapironas do extrato aquoso das folhas de *A. zerumbet*. As atividades hipotensoras, diuréticas e anti-ulcerogênicas estão relacionadas aos flavonóides, o que ajuda a explicar melhor o fato de os animais terem tido uma redução considerável em sua atividade geral. Derivados dehidrokawaina com atividade antiplaquetária foram isolados dos rizomas de *A. zerumbet*. O provável efeito dos derivados se deve à inibição da formação de tromboxano A<sub>2</sub> (TENG *et al.*, 1990). Compostos isolados dos rizomas de *A. zerumbet* apresentaram atividade protetora da mucosa gástrica e duodenal em modelos de úlcera induzidas experimentalmente em roedores (HSU, 1987). Os rizomas de *A. zerumbet* também possuem potentes agentes inibidores da biossíntese de prostaglandinas (KIUCHI *et al.*, 1992). O óleo essencial de *A. zerumbet* apresentou atividade analgésica periférica, anticonvulsivante (Di STASI, 2002), antifúngica (LIMA *et al.*, 1993) e antimicrobiana (Di STASI, 2002). O extrato hidroalcolico do rizoma e das folhas não apresentou atividade moluscicida (Di STASI, 2002). Do óleo essencial das folhas de *A. zerumbet* foi isolado o terpinen-4-ol, que apresentou atividade cardiotônica (Di STASI, 2002). O terpinen-4-ol apresentou também atividade espasmolítica e hipotensora (Di STASI, 2002). Geraniol e isotimol isolados de *A. zerumbet* também possuem potente atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (Di STASI, 2002).

A via de administração escolhida para realizar o teste de toxicidade aguda foi a via oral devido termos o interesse de representar com o máximo de fidedignidade a ingestão de uma infusão pelos humanos, além do fato de a ANVISA preconizar a escolha da via de administração que se pretende usar em humanos.

O fato de o extrato aquoso não ter apresentado nenhum indício de ser tóxico, levanta-se o questionamento: não seria termolábil alguma substância que causasse os efeitos tóxicos dessa planta? Apesar de essa hipótese ser possível, talvez ela não seja muito relevante diante do fato de não haver na literatura nenhum relato de

caso de intoxicação devido a ingestão do chá de colônia, mesmo que ele tenha sido mal preparado.

Danos ao DNA e defeitos no reparo do DNA são os eventos moleculares básicos que dirigem a iniciação e progressão do câncer. O ensaio do cometa é amplamente usado no campo da genética toxicológica, testando células humanas, animais e vegetais (MCKENNA *et al.*, 2008).

O estudo de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética é uma área essencial da toxicologia genética uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese (FENECH *et al.*, 2005). Por outro lado, compostos antitumorais clássicos como a ciclofosfamida são reconhecidos como um agente potencialmente genotóxico. Quando se busca estabelecer os constituintes químicos de um produto natural, faz-se necessário também estabelecer seus possíveis perigos para a saúde humana. Com a *A. zerumbet* não se pode deixar de avaliar todos seus possíveis efeitos no genoma das células animais e humanas, sejam ele benéficos ou maléficos, pois é uma planta utilizada com bastante frequência pela população, não só a brasileira, mas a asiática também. Diante disso, buscamos saber se o extrato aquoso e o óleo essencial apresentavam atividade genotóxica, o que representaria um fator mutagênico de efeitos cumulativos a médio e longo prazo.

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa foram negativos para ação genotóxica do extrato aquoso, em todas as doses utilizadas, e do óleo essencial. Em relação ao controle positivo, a ciclofosfamida nas doses de 25mg/Kg e 50 mg/Kg, a significância estatística foi bastante relevante, com um  $P < 0,001$ . Já em relação ao controle negativo, a salina 0,9%, houve uma semelhança no comportamento das substâncias, com um  $P > 0,05$ . Esses resultados indicam que nem o extrato aquoso nem o óleo essencial apresentam atividades genotóxicas, sejam elas clastogênicas ou aneugênicas.

Os micronúcleos (MN) não pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico perdido do núcleo principal, como consequência de um dano genético, que pode ser causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou

que possam induzir a perda de material genético. O teste do micronúcleo detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (VILLELA *et al.*, 2003).

O teste de micronúcleo em organismos de exposição aguda, menos de quatro semanas, é realizado em eritrócitos jovens, denominados policromatófilos (EPC), que se cora de forma diferenciada por conter RNA ribossomal.

Os resultados obtidos com os testes do micronúcleo para o extrato aquoso e para o óleo essencial foram semelhantes entre si, ou seja, em ambos os casos, as substâncias testadas apresentaram um comportamento semelhante ao do controle negativo, com um  $P > 0,05$  e uma diferença estatisticamente significativa do controle positivo, a ciclofosfamida 25 mg/Kg e 50 mg/Kg, com um  $P < 0,001$ . Esses resultados eram esperados, uma vez que em nenhum dos testes *in vitro* mostrou tendências tóxicas às células. Outro indício de que essas substâncias não eram genotóxicas é o fato de mesmo sem ter acesso aos dados científicos a população usa largamente o chá das folhas da colônia para tratamentos diversos e nunca houve a desconfiança de que esse chá causasse problemas genotóxicos. Com essas informações, podemos afirmar que o ensaio do micronúcleo apenas corrobora com os resultados obtidos do ensaio do cometa, reafirmando uma condição não genotóxica do extrato aquoso e do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*.

Embora muito pouco a respeito dessa planta esteja disponível na literatura científica, principalmente no que se refere ao seu perfil toxicológico, é importante estabelecer esses valores de forma empírica para que se possa fazer o uso de maneira mais adequada dos produtos naturais com características medicinais no Brasil e estabelecer a segurança da saúde da população, principalmente daquela mais carente. Entretanto, reconhecemos que o trabalho ainda está no seu início, requerendo, essa espécie, maiores testes de toxicidade para afirmarmos com segurança de que é uma planta com baixa toxicidade para humanos e animais.

Os próximos testes a serem realizados para esse fim serão os testes de toxicidade crônica, por doses repetidas, e os testes de embriotoxicidade *in vivo*. Com essas análises, juntamente com o estudo histopatológico dos órgãos dos animais tratados nos estudos de toxicidade crônica e embriológica, estabeleceremos o perfil

toxicológico completo de *A. zerumbet*, permitindo assim a realização dos estudos clínicos de fase I, de fase II e de fase III do extrato aquoso.

Em resumo, podemos dizer que a maior contribuição do presente trabalho foi permitir o conhecimento básico necessário para a realização dos estudos clínicos que, por sua vez, proporcionará o conhecimento necessário para a implementação do uso seguro dessa planta como um fitoterápico seguro e útil à população brasileira.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final deste trabalho, podemos concluir que:

- ✓ O perfil toxicológico parcial do extrato aquoso liofilizado das folhas planta da espécie *Alpinia zerumbet* foi estabelecido, sendo esta fração praticamente inócua ao organismo de animais, porém com ações farmacológicas importantes;
- ✓ O extrato aquoso liofilizado das folhas da planta *Alpinia zerumbet* não mostrou ser uma substância tóxica frente a células tumorais de várias linhagens humanas e de camundongos nem a células normais humanas, como os linfócitos, sendo a IC<sub>50</sub> desta substância acima de 5 µg/mL para todas as linhagens de células testadas;
- ✓ O extrato aquoso liofilizado das folhas da planta *Alpinia zerumbet* não mostrou ser uma substância hemolítica;
- ✓ A DL<sub>50</sub> do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Alpinia zerumbet* foi acima de 5.000 mg/Kg, mostrando-se uma substância com baixíssima toxicidade aguda.
- ✓ O extrato aquoso liofilizado das folhas da planta *Alpinia zerumbet* não demonstrou nenhuma atividade genotóxica, resultados evidenciados tanto pelo ensaio do cometa como o do micronúcleo.
- ✓ O óleo essencial das folhas da planta *Alpinia zerumbet* não mostrou ser uma substância tóxica frente a células tumorais de várias linhagens humanas e de camundongos sendo a IC<sub>50</sub> desta substância acima de 5 µg/mL para todas as linhagens de células testadas. Essa substância também não demonstrou ser tóxica contra células normais humanas, como os linfócitos, sendo a IC<sub>50</sub> cerca de 19,76%;
- ✓ O óleo essencial não apresentou atividade hemolítica.
- ✓ O óleo essencial não agiu genotoxicamente, fato evidenciado pelos resultados dos ensaios do cometa e do micronúcleo.

## **7 CONCLUSÃO**

Ao término do trabalho, concluímos que o extrato aquoso e o óleo essencial não foram tóxicos nem genotóxicos.

## REFERÊNCIAS

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. B.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Porto Alegre: EdULBRA, 1995.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993.

ANSAR AHMED, S.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211, 1994.

ARAÚJO-PINHO, F. V. S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v.12, p. 482-486, 2005.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 15. ed. São Paulo: M. V. P., [1974].

BARILE, A. F. Introduction to principles of toxicology. *In*: \_\_\_\_\_. **Principles of Toxicology Testing**. [S.l.]: CRC Press, 2007.

BEZERRA, M. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; FONTELES, M. C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 549–551, 2000.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Altern. Lab. Anim.**, v. 31, n. 3, p. 277-281, 2003.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **ILAR J.**, v. 43, Suppl. S, p. 27-30, 2002.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity prospects for tiered testing strategies. **Toxicol. in Vitro**. v. 18, n. 2, p. 227-230, Apr. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word=toxicidade%20aguda%20de%20fitoter%C3%A1picos>>. Acesso em: 10 set. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 65/SNVS, de 28 de dezembro de 1984. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31.dez.1984. seção1. p. 19931.

BRASIL. Presidência da República. Decreto n.º 79.094, de 5 de janeiro de 1977. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 jan.1977. seção 1, p. 177.

CALIXTO, J. B.; NICOLAU, M. Ações farmacológicas do ácido tânico I. Efeitos sobre o músculo liso e o sistema cardiovascular. *In*: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7., 1982, Belo Horizonte. **Resumo...**Belo Horizonte: editora?, **1982**. p.51.

CALIXTO, J. B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMARGO, M. T. L. A. **Plantas medicinais e de Rituais Afro-Brasileiros II**: estudo etnofarmacobotânico. São Paulo: Ícone, 1998.

CAMARGO, M. T. L. A. Estudo etnofarmacobotânico de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt. & R.M.Sm. *Zingiberaceae*, empregada na medicina popular e em rituais afro-brasileiro. **Herbarium**: Estudos de Etnofarmacobotânica. Disponível em: <<http://www.aguaforte/herbarium/Alpinia.html>>. Acesso em: 29 mar. 2008.

CARLINI, E. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sauvier, 1973.

CARLINI, E. A. "Screening" farmacológico de plantas brasileiras. **Rev. Bras. Biol.**, v. 32, n. 2, p. 265-274, 1972.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. *In*: CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.

COECKE, S.; BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N. *et al.* Toxicokinetics and metabolism. **Altern. Lab. Anim.**, suppl 1, p. 147-175, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C. *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera lahgdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S. MATOS, F. J. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the Monocotyledons**: structure, evolution and taxonomy. Berlin: Springer-Verlag, 1985.

DEFRIES, R.; MITSUSHISHI, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamar blue assay to H-thymidine incorporation assay. **J. Clin. Lab.**, v. 9, n. 2, p. 89-95, 1995.

De POOTER, H. L.; ABOUTABL, E. A.; EL-SHABRAWY, A. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa* (J. C. Wendl.) K. Schum, grown in Egypt. **Flavour Fragrance J.**, v. 10, n. 2, p. 63-67, 1995.

De SMET, P.A.G.M..The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

Di STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Ed. UNESP, 2002.

EKWALL, B. Overview of the final MEIC results: II. The in vitro/in vivo evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. **Toxicol. In Vitro**. v.13, pp. 665–673, 1999.

ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; TAWATA, S. Essential oils, kava pyrones and phenolics compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm. and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 103, p. 486-494, 2007a.

ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; TAWATA, S. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1648-1653, 2007b.

EVANS, H. J.; NEARY, G.J.; WILLIAMSON, F. S.The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on vicia faba roots and the effect of oxygen. **Int. J. Radiation Biol.**, v. 1, p. 216-229, 1959.

FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O Problema da qualidade dos fitoterápicos. **Cad. Farm.**, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol. Med.**, v. 111, p. 3-32, 2005.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Res.**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FLORES & Folhas. *Alpínia* ou colônia (*Alpinia zerumbet*). Disponível em:<<http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/a20alpinia.htm>>. Acesso em: 29 mar. 2008.

FUJITA, T.; NISHIMURA, H.; KABURAGI, K.; MIZUTANI, J. Plant growth inhibiting - pyrones from *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 23–27, 1994.

FUJITA, H.; YAMASHITA, M. The constituents of the essential oil from *Alpinia speciosa* K. Schum. **Yakugaku Zasshi.**, v. 93, n. 12, p. 1635-1638, 1973.

GOMES, B. A. **Plantas medicinais do Brasil**. 2. ed. São Paulo:[s.n.], 1972.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. A importância dos produtos naturais para o homem. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DE FARMACOLOGIA E QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS, 2., 1983, João Pessoa. **Anais...**[S.l.: s.n], 1983. p. 167-175.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Fitoquímica Amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**, v. 3, n. 4, p. 252-263, 1978.

GRIFFIN, R. J. Herbal medicine revisited. **Am. Pharmacol.**, v. 19, n. 10, p. 528, 1979.

GRÜNWALD, J. The European Phytomedicines Market: Figures, Trends, Analysis. **HerbalGram**, v. 34, p. 60-65, 1995.

GUBBELS-VAN HAL, W. M.; BLAAUBOER, B. J.; BARENTSEN, H. M.; HOITINK, M. A.; MEERTS, I. A.; VAN DER HOEVEN, J. C. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 42, n. 3, p. 284-295, 2005.

HALLEUX-OPSOMER, C. Un herbier médicinal du haut moyen âge: l'alfabetum Galieni. **Pub. Staz. Zool. Napoli**, v. 4, n. 1, p. 65-97, 1982.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, p. 703-710, 2000.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, Jan. 2003.

HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, July 2000.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v. 18, n. 2, p. 187-190, May 1973a.

HÖGSTEDT, B.; GULLBERG, B.; MASRK-VENDEL, E.; MITELMAN, F. G.; SKERFVING, S. Micronuclei and chromosome aberrations in bone marrow cells and lymphocytes of humans exposed mainly to petroleum vapors. **Hereditas**, v. 94, n. 2, p. 179-187, 1981a.

HÖGSTEDT, B.; NILSSON, P. G.; MITELMAN, F. Micronuclei in erythropoietic bone marrow cells: relation to cytogenetic pattern and prognosis in acute nonlymphocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 3, n. 3, p. 185-193, Apr. 1981b.

HSU, S. Y. Effects of the constituents of *Alpinia speciosa* rhizoma on experimental ulcers. **Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi.**, v. 86, n. 1, p. 58-64, 1987.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). **Test Method Protocol for BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III.** [S.I.]: National Institute of Environmental Health Sciences, 2003.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). **Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity.** [S.I.]: National Institute of Environmental Health Sciences, 2001. (NIH Publication No. 01-4499).

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). **Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity.** [S.I.]: National Institute of Environmental Health Sciences, 2001. (NIH Publication No. 01-4500).

ITOKAWA, H.; AIYAMA, R.; IKUTA, A. A pungent diarylheptanoid from *Alpinia oxyphylla*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 769-771, 1981a.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; MIHASHI, S. Two new diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* Hance. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 8, p. 2383-2385, 1981b.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, Z.; IITAKA, Y. Novel sesquiterpenes from *Alpinia intermedia* GAGNEP. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 7, p. 2860-2868, 1987.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHIBUYA, M.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 40, n. 2, p. 387-391, Feb. 1992.

KRESS, W. J.; LIU, A. Z.; NEWMAN, M.; LI, Q. J. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers. **Am. J. Bot.**, v. 92, n. 1, p. 167-178, 2005.

KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; WILLIAMS, K. J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **Am. J. Bot.**, v. 89, n. 10, p. 1682-1696, 2002.

KRYSIAK, B.; RYDZYNSKI, K. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. **Med. Pr.**, v. 48, n. 5, p. 561-578, 1997.

LAINETTI, R.; BRITO, N. R. S. **A saúde pelas plantas e erva do mundo inteiro.** Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1980.

LARANJA, S. M. R.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Avaliação de três plantas com potencial efeito diurético. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 38, n. 1, p. 13-16, 1992.

LIMA, E. O.; GOMPertz, O. F.; GIESBRECHT, A. M. & PAULO, M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, p. 333-336, 1993.

LORENZI, H.; MATTOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. São Paulo: Editora Plantarum, 1995.

MacGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mut. Res.**, v. 189, p. 103-112, 1987.

MACHADO, L. D. Alpinia. **Rev. Natureza**, v. 101, n. 5, p. 39-42, 1996.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: boldo, colônia e mentrasto. **O Povo**, Fortaleza, 27 jan. 1988. Universidade Aberta. p. 3.

MATOS, F. J. A. **O formulário fitoterápico do prof. Dias da Rocha**. 2. ed. Mossoró: Fundação Guimarães Duque, 1987. (Coleção ESAM, ano 20, v.18).

MATOS, J. M. D. **Manual prático de farmacologia**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 1979.

MCKENNA, D. J.; MCKEOW, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 183-190, 2008.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S. & FONTELES, M. C. I. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, Suppl. 2, p. 93-97, 1991.

MENDONÇA, V. L. M. **Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum.** Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 1989.

MILLER, O.; TAINTER, M. L. Stimulation of the DL<sub>50</sub> and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 57, p. 261-264, 1944.

MOREIRA, M. R.; CRUZ, G. M.; LOPES, M. S.; ALBUQUERQUE, A. A.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1337-1340, 2001.

MORITA, D. Insecticides and bactericide made of sell flower essential oil. Int. Cl A 01 N 25/00. US Patent 5110594, 1992.

MORITA, M.; NAKANISHI, H.; MORITA H.; MIHASHI, S.; ITOKAWA, H. Structures and spasmolytic activities of derivatives from sesquiterpenes of *Alpinia speciosa* and *Alpinia japonica*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 44, n. 8, p. 1603-1606, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MPALANTINOS, M. A. MOURA, R. S.; PARENTE, J. P.; KUSTER, R. M. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. **Phytother. Res.**, v.12, n. 6, p. 442-444, 1998.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z.; Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability invitro. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.

NEVES, E. S. *apud* SATO, S.; PEREIRA, C. A. S.; CAVASSAN, O.; KUBO, M.; SAURON, V. B.; LAZARINI, C. A.; CURY, A. P.; GOULART, F. C. O uso de plantas nativas de cerrados da região de Bauru na medicina popular-o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Salusvita**, v. 6, n. 1, p. 32-40, 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 1987. (OECD 401, Acute Oral Toxicity).

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 1987. (OECD 402, Acute Dermal Toxicity).

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 1981. (OECD 403. Acute Inhalation Toxicity).

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2001. (OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure).

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2001. (OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method).

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2001. (OECD 425, Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure).

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, n. 1, p. 291-298, Aug. 1984.

PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOËL, C. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. **Int. J. Oncol.**, v. 3, p. 473-476, 1993.

PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Med. Res. Rev.**, v. 18, p. 333-346, 1998.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. São Paulo: IBRASA, 1997.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2002.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P. *et al.* The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Altern. Lab. Anim.**, v. 34, n. 3, p. 315-41, 2006.

PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J.M.; MICHE, G.; BRAVO, R. Chemical analysis bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atoumau from Martinique (*Alpinia speciosa* K schum). **J. Essential Oil Res.** v. 5, p. 255-264, 1993.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicol. Sci.**, v. 43, n. 2, p. 86-101, 1998.

QURESHI, S.; SHAH, A. H.; AGEEL, A. M. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v. 58, n. 2, p. 124-127, 1992.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: \_\_\_\_\_. **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003. p. 173-198.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, R. L. **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS. Ed. Ulbra, 2003. p. 173-198.

SANTANA, C. F.; PINTO, K. V.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Estudos farmacológicos de antiinflamatórios de alguns vegetais. **Rev. Inst. Antibióticos**, n. 1/2, p. 75-89, 1966.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxid present in many plant essential oil. **Phytother. Res.** v.14, p. 240-244, 2000.

SCHMID, W. The micronuclei test. **Mut. Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

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. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar. 1988.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SCHENKEL, E. P. *et al.* A produção de fitoterápicos no Rio Grande do Sul e as Farmacopéias Brasileiras. *In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FARMACOLOGIA E QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS*, 2., 1983, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: LTF, 1983. p. 269-273.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W., Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **Altern. Lab. Anim.**, v. 27, p. 957-966, 1999.

STAMMATI, A.; COMBES, R. D.; SLADOWSKI, D.; VAN DER VALK, J.; BLAAUBOER B. J. Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology. **Toxicol. In Vitro**, v. 19, n. 7, p. 843-844, 2005.

STROBL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discov. Today**, v. 5, p. 29- 41, 2000.

TENG, C. M.; HSU, S. Y. LIN, C. H.; YU, S. M.; WANG, K. J.; LIN, M. H. Antiplatelet action of dehidrokawain derivatives isolated from *Alpinia speciosa* rhizoma. **Chin. J. Physiol.**, v. 33, n. 1, p. 41-48, 1990.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOKAHASNI, R. N.; LIMA, T. C. N.; MORALI, G. S. Ações farmacológicas do ácido tânico. II. Atividade sobre o SNC. *In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 7., 1982, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: [s.n.], 1982. p. 72.

TOMLINSON, P. B. Commelinales - Zingiberales. *In: METCALFE, C. R. Anatomy of the monocotyledons*. Oxford: Clarendon Press, 1969. p. 341-359.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. Instituto de Química. Laboratório de Química Orgânica. **Experimento 6**: introdução à química de produtos naturais: isolamento do eugenol a partir do cravo da Índia. Disponível em:<[http://www.unb.br/iq/litmo/disciplinas/LQO2005\\_2/Roteiros/QPN\\_Eugenol.doc](http://www.unb.br/iq/litmo/disciplinas/LQO2005_2/Roteiros/QPN_Eugenol.doc)> . Acesso em: 10 set. 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Laboratório de Proteção Florestal. **Proteção florestal: toxicologia** Disponível em:<[http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind\\_toxicologia.html](http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind_toxicologia.html)>. Acesso em: 2 set. 2008.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Rev. Eletrônica Farm.**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VAN DEN HEUVEL, M. J.; CLARK, D. G.; FIELDER, R. J.; KOUNDAKJIAN, P. P.; OLIVER, G. J. A.; PELLING, D. *et al.* The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 28, p. 469-482, 1990.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discov. Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. D. Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, RS: Ed. Alcance, 2003.

WINTERS, G. Jardinagem-Zingiberáceas. **Rev. Natureza**, v. 91, n. 7, p. 14-23, 1995.

ZHI-JUN, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S. K.; ANSAR AHMED, S. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **J. Immunol. Methods**, v. 210, p. 25-39, 1997.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. **Flavour Fragrance J.**, v. 14, p. 411-414, 1999.