UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-
americana candidatos ao uso em cosméticos

Natália Mencacci Esteves-Pedro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-
americana candidatos ao uso em cosméticos

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Natália Mencacci Esteves-Pedro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

E79a Esteves-Pedro, Natália Mencacci
Avaliação *in vitro* da toxicidade de óleos essenciais da flora latino-americana candidatos ao uso em cosméticos / Natália Mencacci Esteves-Pedro. -- São Paulo, 2013.
138p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Kaneko, Telma Mary

1. Cosméticos : Segurança : Tecnologia 2. Óleos vegetais : Cosméticos : Tecnologia 3. Óleos essenciais : Farmacologia I. T. II. Kaneko, Telma Mary, orientador.

668.55 CDD

Natália Mencacci Esteves-Pedro

Avaliação *in vitro* da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana
candidatos ao uso em cosméticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
orientadora/presidente

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
1ª. examinadora

Profa. Dra. Olga Zazuco Higa
2ª. examinadora

São Paulo, 04 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu esposo Izael Pedro e à minha mãe Marta Ap. Mencacci, que sempre me apoiaram e lutaram ao meu lado para a conquista desse título.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela Bolsa de Mestrado (processo nº 2010/03053-0) e pelo Auxílio à Pesquisa (processo nº 2011/03822-6).

À Profa. Dra. Telma Mary Kaneko minha orientadora, por permitir a realização desse sonho. Obrigada pelos momentos de reflexão, pelas valiosas discussões, pela amizade, pelo otimismo e principalmente pelo exemplo de ética e profissionalismo.

À Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes colaboradora e querida amiga, que desde a iniciação científica acreditou em mim e no meu sonho em ser pesquisadora, por partilhar seus preciosos conhecimentos, e por tornar os desafios menos tortuosos com seu lindo sorriso e bom humor contagiante.

À colaboradora Dra. Monica Beatriz Mathor por permitir que eu fizesse parte de seu grupo, carinhosamente conhecido por “Turma da Monica”, por dividir seu imenso conhecimento e sempre me chamar à reflexão.

À Ms. Bianca da Silva Sufi, colaboradora e querida amiga, por sua parceria, amizade, criatividade, inteligência, bom humor e pela sua fé. Sem você, esse trabalho também não teria sido o mesmo!

Aos colaboradores Prof. Dr. Paulo H. Moreno, Dr. Daniel Perez, Dra. Kayo Okazaki, Dra. Olga Z. Higa, Prof. Dr. Carlos R. J. Soares, Ms. Renata Albuquerque, Prof. Dr. Sandro Rogerio de Almeida, Ms. Aurea C. L. Lacerda, Ms. Deleia L. Pinto, que partilharam de seus conhecimentos e recursos para que esse trabalho fosse realizado.

Às Dra. Andrea C. D. Rodas e à Ms. Daniele Yoshito, queridas colaboradoras e amigas, que me ensinaram com entusiasmo, profissionalismo e amor a trabalhar com cultura celular. Querida Andrea, obrigada pelos momentos de discussão e reflexão.

Às alunas de iniciação científica Tatiana Matsumoto e Ivette Zegarra, pela parceria durante a execução dos ensaios.

Ao Progamma de Mobilidade Estudantil Santander pela bolsa de estudos para o estágio internacional.

Ao Prof. Dr. Carlos A. M. Afonso e à Dra. Raquel F. M. Frade do grupo de Química Medicinal (iMed. UL) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, que me receberam prontamente e permitiram execução dos ensaios propostos durante o estágio internacional.

Aos amigos e aos colegas de laboratório do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Stefany P. Santin, Marcellly Uemura, Diego Baratelli, Ms. Rodrigo C. Mosca, Bianca Genesi, Dra. Fátima G. Klíngbeil, Ms. Fernando Augusto Neves Soares, Dr. Carlos M. Júnior, Ms. Caroline Ferraz, Gustavo H. Varca e Dayane P. Luco, pela amizade e por serem instrumentos para a minha evolução pessoal.

Aos companheiros de trabalho da Faculdade de Farmácia da USP (FCF-USP): Profa. Dra. Terezinha J. A. Pinto, Prof. Dr. Felipe Lourenço, Ms. Gabriele Ruas, Ms. Wagner Magalhães, Dr. José Sobrinho e Profa. Dra. Irene Satiko, pelo apoio.

A todos os funcionários da secretaria e da limpeza da FCF-USP e do Centro de Biotecnologia do IPEN.

À minha família, em especial ao meu avô Odilon N. Mencacci (in memoriam), aos meus irmãos Alexandre T. Mencacci Esteves e Elmo E. S. Júnior, às minhas tias Cláudia V. Mencacci e Patrícia C. Mencacci, ao meu tio Edson Segamarchi e ao meu pai Elmo E. de Souza, que contribuíram para a conquista e realização desse sonho.

*O conhecimento funda estruturas,
A persistência e a dedicação às fortalecem,
Porém, o amor e amizade às edificam.*

Muito obrigada!

*Minha fé em todas as colheitas do futuro
se afirma no presente.*

Pablo Neruda

RESUMO

ESTEVEES-PEDRO, N.M. **Avaliação *in vitro* da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos**. 2013. 138p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Área de Produção e Controle Farmacêuticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os óleos essenciais provenientes de plantas da flora Latino-americana, têm-se apresentado como candidatos à utilização em formulações cosméticas como fragrâncias, promotores de permeação cutânea, antioxidantes e conservantes naturais. A segurança de componentes da formulação deve ser avaliada por testes toxicológicos validados, que geram resultados reprodutíveis e confiáveis. Os ensaios de citotoxicidade (OECD/GD 129), fototoxicidade *in vitro* (OECD 432), micronúcleo *in vitro* (OECD 487) e atividade antioxidante intracelular correspondem a métodos alternativos pautados nos princípios dos 3R's: *Refinement* ou Refinamento; *Reduction* ou Redução; e *Replacement* ou Substituição. Com essa diretriz, o objetivo proposto foi avaliar a citotoxicidade, a fototoxicidade *in vitro*, o potencial genotóxico e a atividade antioxidante intracelular dos óleos essenciais das espécies *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum e *Drimys brasiliensis* Miers provenientes de plantas da flora Latino-americana, candidatos ao uso em cosméticos. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e foi avaliada a sua dispersão em meio de cultura. A partir dos resultados dos ensaios de citotoxicidade na linhagem BALB/3T3 clone A31, foi calculado o valor de concentração que inibe 50 % (IC₅₀) de células desafiadas. Na avaliação da fototoxicidade *in vitro* na linhagem BALB/3T3 clone A31 e no ensaio do micronúcleo *in vitro* na linhagem CHO-K1, verificou-se respectivamente, os potenciais fototóxico e genotóxico das amostras. Com exceção do óleo essencial da *Drimys brasiliensis*, a atividade antioxidante foi avaliada na linhagem WS1. Os óleos essenciais da *Minthostachys setosa*, *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Drimys brasiliensis* não apresentaram potencial citototóxico, fototóxico e genotóxico, além disso, a atividade antioxidante foi expressiva para *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Segurança de cosméticos. Métodos alternativos. Toxicidade *in vitro*.

ABSTRACT

ESTEVEZ-PEDRO, N.M. ***In vitro* toxicity of essential oils from Latin American plants candidates for use in cosmetics**. 2013. 138p. Dissertação (Mestrado em Frmaco e Medicamentos) - rea de Produo e Controle Farmacuticos, Faculdade de Cincias Farmacuticas, Universidade de So Paulo, So Paulo, 2013.

Essential oils from plants flora Latin America, have been presented as candidates for use in cosmetic formulations as fragrances, skin permeation enhancers, antioxidants and natural preservatives. The safety of the formulation components should be assessed by validated toxicological tests. The cytotoxicity assays (OECD/GD 129), *in vitro* phototoxicity (OECD 432), *in vitro* micronucleus (OECD 487) and intracellular antioxidant activity correspond to alternative methods guided by the 3R's principles: Refinement, Reduction and Replacement. In this scenario, the proposed objective was to evaluate the cytotoxicity, phototoxicity *in vitro*, the genotoxic potential and intracellular antioxidant activity of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum and *Drimys brasiliensis* Miers essential oils, from Latin American plants candidates for use in cosmetics. The essential oils were extracted by hydrodistillation and its dispersion was evaluated in culture medium. The results obtained in cytotoxicity assays on line BALB/3T3 clone A31 was calculated the IC₅₀. *In vitro* phototoxicity in BALB/3T3 clone A31 cell line and the micronucleus assay *in vitro* in the CHO-K1 cell line, it was verify phototoxic and genotoxic potential, respectively. With the exception of essential oil *Drimys brasiliensis*, the intracellular antioxidant activity was assessed in WS1 cell lines. In conclusion *Minthostachys setosa*, *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Drimys brasiliensis* Miers essential oils showed no cytotoxic, phototoxic and genotoxic potential, moreover, the antioxidant activity was expressive for *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Keywords: Essential oils. Safety cosmetics. Alternative methods. Toxicity *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos, como idade das plantas e fatores ambientais. Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007, adaptado pela autora.....	7
Figura 2 -	Biossíntese dos terpenoides. Fonte: CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009.....	8
Figura 3 -	Estrutura química dos monoterpenos: (A) acíclico linalol; (B) monocíclico pulegona; (C) bicíclico α -pineno. Fontes: UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2013a, 2013b, 2013c.....	9
Figura 4 -	Biossíntese de compostos fenilpropanoides. Fontes: SIMÕES; SPITZER, 2007; UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2013d; 2013e, adaptado pela autora.....	10
Figura 5 -	Inflorescência racemosa da <i>Minthostachys setosa</i> . Foto concedida pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.....	13
Figura 6 -	Partes aéreas da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes). (A) Quimiotipo Canévia. (B) Quimiotipo Cataia. (B) Quimiotipo Morro Grande. Fotos concedidas pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.....	15
Figura 7 -	Inflorescência da <i>Drimys brasiliensis</i> . Foto concedida pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.....	17
Figura 8 -	(A) principais organelas envolvidas por membranas internas: peroxissomo; aparelho de Golgi; retículo endoplasmático; vesícula; envelope nuclear; lisossomos e mitocôndrias na célula eucarionte. (B) localização do citosol, marcado em azul, sendo delimitado pela membrana plasmática. Fonte: ALBERTS <i>et al.</i> , 2011.....	24
Figura 9 -	Interfase do ciclo celular, quando a célula aumenta de tamanho, os cromossomos são descondensados e os centríolos e o DNA são duplicados. Fonte: ALBERTS <i>et al.</i> , 2011.....	26
Figura 10 -	Fotomicrografia de imunofluorescência do ciclo celular de células renais normais de rato. Os cromossomos foram corados em azul, os microtúbulos em vermelho e o envelope nuclear (EN) em verde. (A) interfase , presença de um suave aro nuclear; (B) prófase , com invaginações do EN e condensação dos cromossomos; (C) pró-metáfase , o envelope nuclear é fragmentado; (D) metáfase , em que ocorre o alinhamento dos cromossomos e dispersão do EN; (E) anáfase e telófase , ocorrem segregação dos cromossomos e formação do novo EN; (F) citocinese , com maturação das células-filhas. Fonte: BURKE; ELLENBERG, 2002, adaptada pela autora.....	27
Figura 11 -	Diagrama de evolução de uma linhagem celular, representada pela proliferação celular e a realização de subcultivos ao decorrer do tempo. Fontes: HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005, adaptada pela autora.....	30
Figura 12 -	Curva de crescimento e manutenção de uma linhagem permanente, representada pela concentração de células (células/mL) em função do tempo (dias de subcultura) para serem realizadas as subculturas. Fonte: FRESHNEY, 2010, adaptada pela autora.....	31
Figura 13 -	Fotomicrografia da linhagem celular BALB/3T3 clone A31 em alta	

	densidade. Fonte: ATCC, 2013a.....	33
Figura 14 -	Fotomicrografia da linhagem celular CHO-K1 em alta densidade. Fonte: ATCC, 2013b.....	33
Figura 15 -	Fotomicrografia da linhagem celular CRL-1502 em alta densidade. A imagem foi obtida ao microscópio óptico (Nikon TS-100), no aumento de 10x da objetiva.....	34
Figura 16 -	Estrutura química do corante vital Neutral Red (NR). Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2013a.....	35
Figura 17 -	Estruturas químicas dos sais de tetrazólio -MTT, XTT, MTS, WST-1 - e o aceptor de elétrons PMS . Fonte: BERRIDGE; HERST; TAN, 2005.....	36
Figura 18 -	Porcentagem de absorção da radiação solar pelas camadas da pele. Fonte: BOUILLON, 2002, modificada pela autora.....	40
Figura 19 -	Formação do micronúcleo durante as fases do ciclo celular, anáfase e telófase. Fonte: FENECH, 2007 adaptado pela autora.....	42
Figura 20 -	Culturas celulares não tratadas (A) e tratadas com citocalasina B (B).....	43
Figura 21 -	Fases do processo de fluorescência. (1) fase de excitação; (2) fase intermediária; (3) fase de emissão; (4) fase de retorno ao estado fundamental. Fonte: SARTORI; LORETO, 2009; RAHMAN, 2013, adaptado pela autora.....	45
Figura 22 -	Principais componentes de um citômetro de fluxo e a identificação das partículas quanto ao tamanho (<i>Forward Scatter</i> , FSC) e granulosidade (<i>Side Scatter</i> SSC). Fonte: INVITROGEN, 2013 modificada pela autora.....	46
Figura 23 -	Principais rotas de ação das ERO em células eucariontes. Fonte: AVERY, 2011 adaptado pela autora.....	48
Figura 24 -	(A) representação de um tensoativo. (B) adsorção e orientação dos tensoativos nas interfaces óleo e água. Fonte: ROSSI <i>et al.</i> , 2006 adaptado pela autora.....	51
Figura 25 -	Processo de micelização. Fonte: ROSSI <i>et al.</i> , 2006.....	52
Figura 26 -	Fórmula estrutural do polissorbato 20. Fonte: BRASIL, 2010a adaptado pela autora.....	53
Figura 27 -	(A) Aparelho de Clevenger modificado acoplado ao balão de fundo redondo, contendo o material vegetal, e posicionado em manta térmica. (B) Frasco coletor do óleo essencial. Fonte: BRASIL, 2010b adaptado pela autora.....	59
Figura 28 -	Esquema da disposição das células na placa de 96 poços. Fonte: NIH, 2001.....	63
Figura 29 -	(A) Esboço de câmara de fototoxicidade com área total de aproximadamente 0,153 m ² e área de trabalho de 153.000 cm ² . (B) Fotografia da câmara de fototoxicidade finalizada. Figuras concedidas pela Ms. Bianca da Silva Sufi.....	68
Figura 30 -	Esquema representativo do teste do micronúcleo <i>in vitro</i> após 48 horas de incubação das células CHO-K1 (OECD 487, 2010).....	70
Figura 31 -	Procedimento de gotejar a solução de fixador em lâminas posicionadas sobre o banho termostatzado a 65 °C.....	71
Figura 32 -	Exposição à lâmpada fluorescente das amostras no teste do MNvit por citometria de fluxo.....	73
Figura 33 -	(A) citômetro de fluxo FACSCanto TM II (BD Biosciences®). (B) em	

	destaque o tubo de citômetro com a amostra.....	74
Figura 34 -	Citômetro de Placas (Gava Easy Cyte HT, Millipore®).....	75
Figura 35 -	Diluições seriadas da mistura A em meio de cultura. (A) após 24 horas de em estufa. (B) após 48 horas em estufa.....	81
Figura 36 -	Diluições seriadas da mistura B em meio de cultura. (A) após 24 horas em estufa. (B) após 48 em estufa.....	81
Figura 37 -	Dispersões do óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i> + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas.....	82
Figura 38 -	Dispersões do óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Cananéia) + polissorbato 20 + meio de cultura para as células (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas.....	83
Figura 39 -	Dispersões do óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Cataia) + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas.....	84
Figura 40 -	Dispersões do óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Morro Grande) + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas.....	85
Figura 41 -	Dispersões do óleo essencial da <i>Drimys brasiliensis</i> + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas.....	86
Figura 42 -	Dispersões do óleo essencial da bergamota + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas.....	86
Figura 43 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i> por 24 (A) e 48 horas (B).....	89
Figura 44 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Cananéia por 24 (A) e 48 horas (B).....	89
Figura 45 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Cataia por 24 (A) e 48 horas (B).....	90
Figura 46 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Morro Grande por 24 (A) e 48 horas (B).....	90
Figura 47 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da <i>Drimys brasiliensis</i> por 24 (A) e 48 horas (B).....	90
Figura 48 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem CHO-K1 após 24 horas de exposição aos óleos essenciais da <i>Minthostachys setosa</i> (A), da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipos Cananéia (B), Cataia (C), Morro Grande (D) e <i>Drimys brasiliensis</i> (E).....	94
Figura 49 -	Porcentagem de viabilidade celular na linhagem WS1 após 24 horas de exposição aos óleos essenciais da <i>Minthostachys setosa</i> , da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande.....	95

Figura 50 -	Porcentagem de viabilidade das células BALB/3T3 clone A31 às diferentes concentrações em mg/mL após exposição à luz UVA e ao abrigo. As amostras avaliadas foram: <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), <i>Minthostachys setosa</i> , <i>Drimys brasiliensis</i> , LSS o lauril sulfato de sódio (controle negativo) e óleo de bergamota (controle positivo). Gráficos elaborados no programa PHOTOTOX®	97
Figura 51 -	Valores de PIF das células BALB/ 3T3 clone A31 submetidas ao ensaio de fototoxicidade.....	98
Figura 52 -	Células CHO-K1 submetidas ao teste MNvit e coradas com Giemsa Stain. Fotomicrografia obtida a partir da observação das lâminas ao microscópio óptico (Nikon 80I), nos aumentos de 10x (A) e 20x (B, C, D, E e F) da objetiva. (A) amostra benzopireno (BZP), presença de CM, CB, CM com um MN. (B) amostra BZP, presença de CB. (C) CB com MN. (D) amostra NaCl sem S9, presença de CB e CM com MN. (E) amostra NaCl sem S9, presença de CM, CMu, CB e uma CB com dois MN. (F) amostra NaCl com S9, presença de CB com um MN e grânulos.....	99
Figura 53 -	Média da porcentagem da frequência de MN na linhagem CHO-K1 expostas aos óleos essenciais da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), <i>Minthostachys setosa</i> , <i>Drimys brasiliensis</i> , controle de células, NaCl, benzo[α]pireno, colchicina e mitomicina C. (A) amostras sem S9. (B) amostras com S9.....	102
Figura 54 -	Histogramas do controle de células sem S9, com a estratégia para determinar a população celular de CHO-K1 para isolar os núcleos (N), núcleos com hipodiploidia (H) e micronúcleos (MN).....	105
Figura 55 -	Porcentagem de micronúcleo das células CHO-K1 submetidas às amostras com e sem S9, por citometria de fluxo.....	106
Figura 56 -	Histograma da distribuição quantitativa das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) do ciclo celular do controle de células sem S9.....	108
Figura 57 -	Porcentagem da distribuição da fase subG1 das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo.....	109
Figura 58 -	Porcentagem da distribuição da fase G1 das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo.....	109
Figura 59 -	Porcentagem da distribuição da fase S das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo.....	110
Figura 60 -	Porcentagem da distribuição da fase G2 das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo.....	110
Figura 61 -	Produção de ERO nas células WS1 expostas às amostras dos óleos essenciais da planta <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipos Cananéia (A), Morro Grande (B) e Cataia (C) e da planta <i>Minthostachys setosa</i> (D).....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Termos descritivos de solubilidade e seus significados. Fonte: BRASIL, 2010b.....	61
Tabela 2 -	Concentração dos óleos essenciais e do tensoativo polissorbato 20 nas dispersões dos meios de cultura D10 e RPMI10.....	62
Tabela 3 -	Intervalo das concentrações dos óleos essenciais provenientes do cálculo do CMI pelos fatores de diluição 2,15; 1,47 e 1,21.....	65
Tabela 4 -	Média da massa (g) a cada 0,5 mL do óleo essencial, desvio padrão (DP) da massa e a densidade relativa (dR) a 25 °C para óleos essenciais <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> , <i>Drimys brasiliensis</i> e bergamota.....	80
Tabela 5 -	Valores de IC ₅₀ (mg/mL) do óleo essencial de bergamota submetido aos métodos de detecção da viabilidade celular por MTS/PMs e NR em cinco experimentos independentes.....	87
Tabela 6 -	Valores de, R ² das curvas e IC ₅₀ com suas respectivas médias e desvio padrão (DP) para óleos essenciais da <i>Minthostachys setosa</i> ; <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande; e <i>Drimys brasiliensis</i> ; para os cinco ensaios independentes com 24 horas de contato das amostras na linhagem BALB/3T3 clone A31.....	91
Tabela 7 -	Valores de, R ² das curvas e IC ₅₀ com suas respectivas médias e desvio padrão (DP) para óleos essenciais da <i>Minthostachys setosa</i> ; <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande; e <i>Drimys brasiliensis</i> ; para os cinco ensaios independentes com 48 horas de contato das amostras na linhagem BALB/3T3 clone A31.....	92
Tabela 8 -	Valores de p-valor e média das diferenças entre os valores de IC ₅₀ 24 e 48 horas para os óleos essenciais da <i>Minthostachys setosa</i> ; <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande; e <i>Drimys brasiliensis</i>	93
Tabela 9 -	Médias do CBPI (<i>Cytokinesis-Block Proliferation Index</i>) e RI (<i>Replication Index</i>) das amostras com e sem S9 dos óleos essenciais da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), <i>Minthostachys setosa</i> , <i>Drimys brasiliensis</i> , controle de células, NaCl, benzo[<i>a</i>]pireno, colchicina e mitomicina C.....	100

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	19
Equação 2 -	60
Equação 3 -	60
Equação 4 -	64
Equação 5 -	64
Equação 6 -	66
Equação 7 -	68
Equação 8 -	71
Equação 9 -	71
Equação 10 -	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Nota: nesta Lista em ordem alfabética foram incluídas as abreviaturas e siglas utilizadas com mais frequência. Em algumas situações optou-se por manter a designação em inglês ou por dificuldades de tradução ou por ser a designação mais comum na comunidade científica.

µg – micrograma (s)

µL – microlitro (s)

µM - micro Molar

µM – micromolar (s)

a/o - emulsão água em óleo

a/o/a - emulsão múltipla água, óleo e água

cm – centímetro (s)

g – grama (s)

J – joule (s)

km – quilômetro (s)

Kpa – quilopascal

L – litro (s)

M – molar

m² - metro quadrado

mg – miligrama (s)

mL – mililitro (s)

mM - mili molar

mW - mili Watt

nm – nanômetro (s)

o/a - emulsão óleo em água

o/a/o - emulsão múltipla óleo, água e óleo

p/v - massa do soluto (g) volume da solução (mL)

v/v - volume do soluto (mL) volume da solução (mL)

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC[®] - *American Type Culture Collection*

ATLA - *Alternatives to Laboratory Animals*

ATP - adenosina trifosfato

BCF - *Bovine Calf Serum*

BfR - *Bundesinstitut für Risikobewertung*

BraCVAm - Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

BZP - benzo[α]pireno

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CB – célula binucleada

CBPI - *Cytokinesis-Block Proliferation Index*

CC - controle de células

citoB - citocalasina B

CLDB - *Cell Line Data Base*

CM - célula mononucleada

CMC - concentração micelar crítica

CMI - concentração mínima inibitória

CMu – célula multinucleada

CO₂ - dióxido de carbono

Colch - colchicina

COLIPA - *European Cosmetics Association*

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT - células tratadas

CTFA - *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association*

CTFA - *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association*

d - densidade

D10 - meio DMEM suplementado com 10 % de DBS

DBS - *Donnor Bovine Serum*

DL₅₀ - dose Letal que provoca a morte de 50 % da população em estudo

DMEM - *Dubelcco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - *deoxyribonucleic acid*

DS – dose diária absorvida

EC - *European Commission*

ECACC - *European Collection of Cell Culture*

ECVAM - *European Committee for Validation of Alternative Methods*

EDTA - *ethylene diamine tetracetic acid*

EHL - equilíbrio hidrófilo-lipófilo

EMA - *ethidium monoazide*

EMEM - *Minimum Essential Medium*

EPA - *Environmental Protection Agency*

ERO - espécies reativas de oxigênio

et. al - *et alia*, e outros

F – fator de diluição

F-12K - *Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium*

FMN - frequência de micronúcleo

FRAME - *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments*

FSC - *Forward Scatter*

IC₁₀ .concentração que inibi 10 % das células desafiadas

IC₂₀ .concentração que inibi 20 % das células desafiadas

IC₅₀ - concentração que inibi 50 % das células desafiadas

IC₈₀ .concentração que inibi 80 % das células desafiadas

ICATM - *International Cooperation on Alternative Methods*

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

ICLC - *Interlab Cell Line Collection*

IEPLAM - *Instituto de Ecologia y Plantas Medicinales*

IRAG - *Interagency Regulatory Alternatives Group*

ISO - *International Organization for Standardization*

JCRB - *Japanese Collection of Research Bioresources*

JTCA - *Japanese Tissue Culture Association*

KCl – cloreto de potássio

LSS - lauril sulfato de sódio

m - massa

MCTI - Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação

MEIC - *Multicentre Evaluation of In vitro Cytotoxicity*

MgCl₂ - cloreto de magnésio

MN - micronúcleo

MNvit - Teste do micronúcleo *in vitro*

MS - margem de segurança

MTMC - mitomicina C

MTS - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

NaCl – cloreto de sódio

NADP - *β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NICEATM - *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*

NIEHS - *National Institute of Environmental Health Sciences*

NIH - *National Institutes of Health*

NOAEL - *No Observed Adverse Effect Level*

NR - *neutral red*

NTP - *National Toxicology Program*

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*

P - passagem celular

PBS - *Phosphate buffered*

PBS+ - *Phosphate buffered saline com cálcio de magnésio*

pH - potencial hidrogeniônico

PIF - *Photo Irradiation Fator*

PMS - *phenazine methosulfate*

q.s.p. - quantidade suficiente para

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

REACH - *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical*

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos

RI - *Replication Index*

RNA - *ribonucleic acid*

rpm – rotações por minuto

RPMI10 – meio RPMI suplementado com 10 % de FBS

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute medium 1640*

SCCS - *Scientific Committee on Consumer Safety*

SFB - Soro Fetal Bovino

SSC - *Side Scatter*

Tw20 – polissorbato 20

UKNCC - *United Kingdom National Culture Collection*

UV - ultravioleta (radiação)

V – volume

VA – valores de concentração acima da concentração de efeito biológico

VB – valores de concentração abaixo da concentração de efeito biológico

VIS - luz visível

WHO - *World Health Organization*

WST-1 - *5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium*

XTT - *2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide*

ZEBET - *Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

< - menor que

$\leq$ - menor igual que

> - maior que

® - marca registrada

°C - grau Celsius

α - alfa (radiação)

β - beta (radiação)

γ - gama (radiação)

λ - comprimentos de onda

™ - *trademark*

Δ - delta, diferença cientificamente significativa

R^2 - coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Óleos essenciais	6
2.1.1 <i>Minthostachys setosa</i> (Briq.) Epling	12
2.1.2 <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum	14
2.1.3 <i>Drimys brasiliensis</i> Miers	16
2.2 Métodos alternativos de avaliação da segurança e eficácia aplicados em cosméticos... 18	
2.2.1 Cultura de linhagens celulares eucariontes	23
2.3 Avaliação da Toxicidade <i>in vitro</i>	34
2.3.1 Teste de citotoxicidade	34
2.3.2 Teste de fototoxicidade	38
2.3.3 Teste do micronúcleo <i>in vitro</i> (MNvit).....	41
2.4 Atividade antioxidante intracelular	47
2.5 Dispersão dos óleos essenciais em meio de cultura	49
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivos específicos.....	55
4 MATERIAL e MÉTODOS	56
4.1 Material.....	57
4.2 Métodos	58
4.2.1 Extração dos óleos essenciais.....	59
4.2.2 Determinação da densidade relativa	60
4.2.3 Dispersão do óleo essencial dos óleos essenciais em meio de cultura	61
4.2.4 Comparação das técnicas de detecção de viabilidade celular	62
4.2.5 Teste de citotoxicidade	64
4.2.6 Teste de fototoxicidade	66
4.2.7 Teste de genotoxicidade.....	69
4.2.8 Atividade antioxidante intracelular	74
4.2.9 Análise estatística	75
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS	116
ANEXOS.....	132
ANEXO A	133
ANEXO B	134

ANEXO C	135
ANEXO D	136
ANEXO E.....	137
ANEXO F.....	138

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de ativos naturais está aliada a tendência do mercado em utilizá-los em medicamentos e cosméticos. O conceito “natural” tornou-se decisivo para o desenvolvimento de novos agentes ativos que deverão ser eficazes e seguros, ao mesmo tempo, sustentáveis e substitutos aos de origem sintética (IBARRA; JOHNSON, 2008). Embora os componentes sintéticos exibam frequentemente melhor desempenho que os naturais, muitas vezes, não podem ser degradados ou absorvidos pelas estruturas biológicas. É importante destacar que as substâncias novas, sintéticas ou naturais, que apresentem atividades e que são consideradas candidatas a uso farmacêutico e cosmético devem ser testadas extensivamente quanto a sua toxicidade, antes de serem liberadas para o uso. Tradicionalmente os testes de toxicidade podem envolver como reagente biológico animais, entretanto a tendência atual é a substituição por métodos *in vitro*.

Historicamente, o início da discussão sobre o uso de animais em ensaios toxicológicos e de eficácia foi com a publicação do livro *Principles of Human Experimental Technique* em 1959. Assim, despertaram-se a conscientização e ocorreram os movimentos de proteção aos animais. A partir deste episódio, fica estabelecido o princípio dos 3R's que correspondem a: *Refinement* ou Refinamento promove o alívio ou minimização da dor e o estresse dos animais; *Reduction* ou Redução responsável pela diminuição no número de animais utilizados para obter a mesma qualidade de informações dos testes clássicos *in vivo*; e *Replacement* ou Substituição estabelece que, um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos. Baseado nesse conceito surge o termo “métodos alternativos” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2003; RUSSEL; BURCH, 2009; REDE NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS (RENAMA), 2013).

Com relação à validação de métodos alternativos, diversas instituições internacionais renomadas estão envolvidas, tais como: a pioneira *European Committee for Validation of Alternative Methods* (ECVAM); *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA); *European Cosmetics Association* (COLIPA); *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM); e *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Dentre os métodos alternativos validados estão a fototoxicidade, o teste do micronúcleo *in vitro* e citotoxicidade, realizados em linhagens celulares eucariontes (ANVISA, 2003).

O marco regulatório dos métodos alternativos ocorreu em 2003 com a 7th *Amendment to the Cosmetics Directive 2003/15/EC* que proibiu o uso de animais em testes para ingredientes e/ou produtos cosméticos a partir de 2013. A Diretiva assegurava, portanto, a comercialização, na

Comunidade Europeia, de produtos cosméticos sem a avaliação por experimentação animal, mas com segurança garantida aos consumidores. Considerando a importância dos produtos e ingredientes brasileiros no mercado europeu de cosméticos, os métodos alternativos estão sendo implantados. Em 2009 no Brasil, houve a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), responsável pelo credenciamento das instituições que utilizem animais em seus trabalhos, e em 2012 a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), que promoverá a certificação e validação de novos métodos alternativos. O processo de validação propostos e/ou desenvolvidos pela RENAMA ocorrerá no âmbito do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos, BraCVAM (ANVISA, 2003; EUROPEAN COMMISSION (EC), 2003; BRASIL, 2009; BRASIL, 2012).

Destaca-se que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), elaborou o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos que, recomenda o uso de métodos alternativos validados nos ensaios de segurança para produtos acabados e ingredientes cosméticos. Utilizados como ingredientes em formulações cosméticas, os óleos essenciais, formados a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipossolúveis e de odor característico (ANVISA, 2003; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; BAKKALI, *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais possuem além de suas propriedades odoríferas, atividades biológicas que os tornam candidatos ao uso em formulações farmacêuticas e cosméticas. Dentre essas atividades destacam-se a promotora de permeação cutânea, antioxidante e antimicrobiana. Desse modo, espécies de plantas derivadas de ecossistemas diversificados apresentam-se como alvo de pesquisas, como a flora Latino-americana que compreende 52 % de todas as florestas tropicais existentes ao redor do planeta (GUERRA; NODARI, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2004; BROCHINI; LAGO, 2007).

Dentre as espécies de plantas da flora Latino-americana têm-se: *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum e *Drimys brasiliensis* Miers. Popularmente conhecida como *Munã*, a espécie *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling é utilizada pelas comunidades andinas como conservantes de alimentos (HOLGUÍN, 2005) e segundo Pinto (2010) o óleo essencial desta planta, apresenta-se como candidato à conservante natural de formulações cosméticas devido as suas características antimicrobianas. Encontrada na Mata Atlântica, a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum é popularmente conhecida como craveiro-do-mato e de acordo com Lima e colaboradores (2006) apresentou expressiva atividade

antimicrobiana em seu óleo essencial. Popularmente conhecida como casca-d'anta, a *Drimys brasiliensis* Miers apresenta em seu óleo essencial uma rica composição em terpenos, substância com considerável atividade antimicrobiana (LIMBERGER *et al.*, 2008).

A comprovação dessa atividade antimicrobiana possibilita a utilização destes óleos essenciais como conservantes naturais, em associação ou mesmo em substituição aos de origem sintética que poderiam apresentar reações tóxicas ao usuário. Dessa forma, a seleção definitiva do agente conservante deve ter um compromisso entre eficácia antimicrobiana e compatibilidade com o produto acabado, além da segurança ao consumidor avaliada por testes toxicológicos (LAHLOU, 2004; LIMA, *et al.*, 2006; CUSTÓDIO, *et al.*, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Nos estudos das propriedades toxicológicas e farmacológicas dos óleos essenciais em linhagens celulares eucariontes, a lipossolubilidade confere dificuldades de dispersão em meios de cultura (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009). Desta forma, há a necessidade da dispersão dos óleos essenciais por meio de agentes em concentração não citotóxicas, evitando os resultados falso-positivos.

Nesse cenário, verifica-se a importância da investigação dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, da *Minthostachys setosa* e da *Drimys brasiliensis*, provenientes de plantas da flora Latino-americana, como candidatos a componente de formulações cosméticas. Assim, fundamentados em métodos alternativos, faz-se necessária à avaliação da atividade antioxidante intracelular e toxicidade *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis de forte odor, formados a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas que geram compostos de baixo peso molecular. Esses são sintetizados pelas folhas, caules, flores, pétalas, frutos, sementes, raízes, ou casca, e armazenados nas células epidérmicas, tricomas glandulares e células secretoras. A volatilidade e o forte odor são resultados da solubilização das gotículas refringentes, presentes nas estruturas secretoras, por compostos voláteis responsáveis pelas propriedades odoríferas (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; BAKKALI, *et al.*, 2008).

As características odoríferas dos óleos essenciais fundamentam a sua utilização nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos como aromas, adjuvantes corretivos de odor e sabor em medicamentos, aromatizantes em medicamentos de aplicação tópica, e como fragrâncias em cosméticos. Dentre as atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, destacam-se: promotora de permeação cutânea; anestésica; analgésica; anti-inflamatória; gastroprotetora; antiulcerosa; antiespasmódica intestinal; hepatoprotetora; broncodilatadora; antihelmíntica; antiviral; antifúngica e antibacteriana (BROCHINI; LAGO, 2007; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; FANG *et al.*, 2004).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está associada à presença de compostos oxigenados, como por exemplo, o eugenol e o linalol capazes de realizar ligações de hidrogênio. Assim, modificam a permeabilidade da membrana externa dos micro-organismos e inibem enzimas da cadeia respiratória, responsáveis pelo balanço energético dessas células. A eficácia dos óleos essenciais tem motivado pesquisas na avaliação e caracterização de sua atividade antimicrobiana, no entanto, a execução dos métodos é condicionada pela sua lipossolubidade. A limitada solubilidade em água confere aos óleos essenciais o uso de solventes orgânicos apolares durante os processos de extração (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009).

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam conforme sua localização na planta e sua proposta de utilização. Dentre os métodos destacam-se: enfloração (*enfleurage*), empregado em plantas com baixo teor de óleo e alto valor comercial, consiste em depositar as pétalas numa camada de gordura durante um período de tempo, em seguida a gordura é tratada com álcool que é destilado em baixa temperatura; extração por solventes orgânicos, como éter e diclorometano; prensagem (ou expressão), o pericarpo dos frutos é prensado e a camada que contém o óleo essencial é separada; CO₂ (dióxido de carbono) supercrítico, o CO₂ é liquefeito e aquecido a 31 °C, atingindo o quarto estado da matéria em que sua capacidade de dissolução é elevada e permite a obtenção do óleo

essencial sem o uso de solventes orgânicos; e hidrodestilação (ou arraste por vapor d'água), o mecanismo de ação se baseia na diferença da tensão de vapor dos óleos essenciais e da água, a alta tensão dos óleos faz com que sejam arrastados pelo vapor d'água (SIMÕES; SPITZER, 2007).

O produto de extração e metabólitos secundários (Figura 1) pode variar na composição, qualidade e quantidade de acordo com a fisiologia e idade das plantas e com os aspectos ambientais (ou edáficos) extrínsecos à biologia vegetal, tais como: sazonalidade; índice pluviométrico; ritmo circadiano; radiação ultravioleta (UV); alterações na composição atmosférica pela poluição; altitude; temperatura; disponibilidade de água, micronutrientes e macronutrientes assimiláveis pelas plantas; ataque de patógenos; e pastagem de herbívoros (ou herbivoria) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009).

Figura 1- Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos, como idade das plantas e fatores ambientais. Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007, adaptado pela autora

Para a obtenção de óleos essenciais de composição constante, esses devem ser extraídos nas mesmas condições a partir do mesmo órgão da planta, que cresceu no mesmo solo, sob o mesmo clima e foi coletada na mesma temporada. Ainda assim, uma mesma população pode resultar em óleos essenciais com composição química diferente caracterizada pelas diferenças genéticas. Como consequência, particularmente em espécies das famílias Apiaceae, Lamiaceae e Myrtaceae a expressão das vias metabólicas dessas plantas é distinta sendo designadas como variedades químicas ou quimiotipos (MASOTTI, *et al.*, 2003; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; BAKKALI, *et al.*, 2008).

A composição química da maioria dos óleos essenciais é constituída por derivados terpênicos e/ou fenilpropanoides. Os hidrocarbonetos terpênicos são formados a partir da combinação de bases de cinco carbonos (C5) chamada isopreno. A condensação dos isoprenos pirofosfato de isopentenilo (PPI), formado no ciclo do acetato-mevalonato, e seu isômero o pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), originam o pirofosfato de geranilo precursor dos monoterpênicos (C10), sua condensação com o PPI forma o sesquiterpenoide (C15) pirofosfato de farnesilo, que ao se condensar com PPI forma o diterpenoide (C20) pirofosfato de geranil-geranilo, como demonstrado na Figura 2 (SIMÕES; SPITZER, 2007; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; SCHWAB; FUCHS; HUANG, 2013).

Figura 2 - Biossíntese dos terpenoides. Fonte: CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009

Destaca-se que, os monoterpênicos constituem cerca de 90 % dos óleos essenciais, podendo ser divididos nos subgrupos acíclicos (mirceno, linalol), monocíclicos (pulegona, α -terpineol, terpinoleno, limoneno) e bicíclicos (α -pineno, tujona, cânfora), representados na Figura 3 (SIMÕES; SPITZER, 2007; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; ARAÚJO; FARIAS, 2003; PINTO, 2010).

Figura 3 - Estrutura química dos monoterpenos: (A) acíclico linalol; (B) monocíclico pulegona; (C) bicíclico α -pineno. Fontes: UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2013a, 2013b, 2013c

Os fenilpropanoides são compostos aromáticos menos frequentes que os terpenoides nos óleos essenciais. Com relação a sua biossíntese (Figura 4), são formados a partir do ácido chiquímico que forma as unidades básicas de ácido cinâmico e *p*-cumárico. Por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzeno e alilbenzenos, por oxidações geram aldeídos aromáticos e por ciclizações enzimáticas produzem as cumarinas, exemplificados nos compostos eugenol; cinamaldeído e bergapteno (furanocumarinas) (SIMÕES; SPITZER, 2007; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; JAGANATHAN; SUPRIYANTO, 2012; NOVA; ARRUDA; OLIVEIRA, 2012).

Legenda: (1) ácido chiquímico; (2) ácido cinâmico; (3) *p*-cumárico; (4) propenilbenzeno; (5) aldeídos aromáticos; (6) alilbenzenos; (7) cumarinas; (A) alilbenzeno eugenol; (B) furanocuramina bergapteno

Figura 4 - Biossíntese de compostos fenilpropanoides. Fontes: SIMÕES; SPITZER, 2007; UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2013d; 2013e, adaptado pela autora

A identificação quantitativa dos compostos presentes nos óleos essenciais pode ser realizada por meio de análises cromatográficas, como por exemplo, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Esse método permite a separação dos componentes e fornece um espectro de massa para cada pico, que indica a massa molecular e o padrão de fragmentação que, comparado aos das substâncias de bibliotecas resultam na proposta de probabilidade quanto à identidade da substância analisada (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Dessa forma, essa identificação dos óleos essenciais contribui na avaliação de suas atividades biológicas e de seus compostos majoritários, ou seja, aqueles presentes em maior quantidade. Por exemplo, o eugenol é o composto majoritário presente em 72 a 90 % no óleo essencial da planta *Eugenia aromaticum*, dentre suas atividades biológicas se destacam a anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (JAGANATHAN; SUPRIYANTO, 2012).

No entanto, os óleos essenciais, considerados misturas complexas, devem ser avaliados em sua totalidade. Segundo Lago e colaboradores (2010), o efeito anti-inflamatório do óleo essencial da *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) foi superior a um dos seus compostos majoritários isolados, o sequesterpeno poligoidal. Assim como, o óleo essencial da *Minthostachys setosa* quando comparado ao seu composto majoritário pulegona, pode apresentar expressiva atividade antimicrobiana (PINTO, 2010).

A comprovação das atividades biológicas dos óleos essenciais e seus componentes majoritários, em especial a atividade antimicrobiana, possibilita a utilização destes como conservantes naturais, ainda pouco explorados, em substituição aos conservantes de origem sintética que apresentam reações tóxicas ao usuário. Ressalta-se que, durante a escolha do agente conservante adequado são necessárias algumas considerações, dentre elas, quanto ao tipo do produto, seu uso, características de formulação e o provável desafio microbiano. Frente a este contexto, a seleção definitiva do agente conservante deve ser um compromisso entre eficácia antimicrobiana, compatibilidade com o produto e segurança ao consumidor, confirmada por meio de ensaios toxicológicos (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Na tentativa de elucidar os possíveis efeitos tóxicos dos óleos essenciais, diversos grupos de pesquisa realizam estudos toxicológicos *in vitro*. Por exemplo, Nathalie e colaboradores (2006) avaliaram a fototoxicidade *in vitro* de cinco diferentes óleos essenciais e potenciais candidatos ao uso em cosméticos, devido a suas atividades odorífera e antimicrobiana. Outro estudo demonstrou que, a atividade antimicrobiana do óleo essencial da planta *Cinnamomum zeylanicum* Blume indicou sua potencial aplicação em formulações de uso tópico para tratamento de infecções, além disso, esse óleo apresentou propriedades anticancerígenas nos ensaios em linhagens de fibroblastos normais e transformados (UNLU *et al.*, 2010).

Hayes e Markovic (2002) verificaram a expressiva atividade antimicrobiana do óleo da planta *Backhousia citriodora* e a IC₅₀ (concentração que inibi 50 % das células desafiadas) por meio do ensaio de citotoxicidade em células normais e cancerígenas, baseando-se nesses resultados os pesquisadores determinaram a concentração segura para ser utilizada em formulações tópicas. Ainda, no estudo de revisão de Bakkali e colaboradores (2008) foi verificado que, em células eucariontes os óleos essenciais em determinadas concentrações podem exercer atividades citotóxicas e antigenotóxicas, por estes achados os autores sugeriram que essas atividades ocorrem devido aos efeitos pró-oxidantes dos óleos essenciais em nível celular.

Diante do exposto, verifica-se que os óleos essenciais e seus compostos majoritários, possuem além de suas propriedades odoríferas, atividades biológicas que os tornam candidatos ao uso em formulações farmacêuticas e cosmética. Adicionalmente, a flora Latino-americana possui o ecossistema diversificado e rico, que compreende 52 % de todas as florestas tropicais existentes ao redor do planeta. Entretanto, faz-se necessária pesquisa criteriosa e urgente com os óleos essenciais, pois, em sua maioria são provenientes de plantas originárias de ecossistemas ameaçados de extinção (GUERRA; NODARI, 2007).

Dentre essas florestas a Mata Atlântica, atualmente é identificada como a quinta área mais ameaçada e rica em espécies endêmicas do mundo, pois, da sua cobertura florestal original de 1,3 milhão de km² restam apenas 5 %, dispostos em fragmentos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Esse complexo e exuberante conjunto de ecossistemas possui cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, das quais oito mil delas são exclusivas desse bioma (ou endêmicas), como por exemplo, as espécies vegetais *Drimys brasiliensis* Miers e *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum utilizadas na medicina popular. Ainda na flora Latino-americana, destaca-se a espécie *Minthostachys setosa*, encontrada nos altiplanos andinos entre a Venezuela e a Argentina, é também utilizada na medicina popular pelos moradores dos Andes no Peru (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2002; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2004; MARTINS; RÓZ; MACHADO, 2013; LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2007; FARIAS *et al.*, 2009; PINTO, 2010).

2.1.1 Minthostachys setosa (Briq.) Epling

A espécie *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling pertence à família Lamiaceae (ou Labiatae) da menta ou hortelã. Sua denominação original Labiatae é devido às pétalas das flores se assemelharem a lábios. Quanto à anatomia vegetal, estas plantas crescem em forma de arbustos e árvores que possuem caule quadrangular com folhas opostas, inteiras ou divididas, e inflorescência racemosa, que corresponde ao crescimento de os ramos laterais (Figura 5). Dentre as plantas desta família destacam-se, além da hortelã, alecrim, manjerição, sálvia, tomilho e lavanda, pois, possuem propriedades aromáticas e são amplamente utilizadas como ervas culinárias e em formulações cosméticas. Ressalta-se que, esta família tem uma distribuição mundial e dispõe de aproximadamente 6900 espécies e 233 gêneros (LEE *et al.*, 2011; BRÄUCHLER; MEIMBERG; HEUBL, 2010; RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001).

Figura 5 - Inflorescência racemosa da *Minthostachys setosa*. Foto concedida pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

O gênero aromático *Minthostachys* possui arbustos escandentes, como as trepadeiras, ou que necessitam de suporte para ganhar altura são encontrados na região andina da América do Sul. Sua elevada variabilidade morfológica foi responsável pela dificuldade na classificação de suas espécies. Inicialmente em 1936, o pesquisador Carl Clawson Epling classificou o gênero *Minthostachys* em 12 espécies, porém, no em 1963 o mesmo sugeriu que as espécies fossem classificadas em monotípico altamente variável, designado *Minthostachys mollis*. Assim, durante décadas a *Minthostachys* foi tratada como monotípico ou não, resultando em pesquisas com falta de comparação e reprodutibilidade entre as espécies botânicas. No ano de 2008, o pesquisador Alexander N. Schmidt-Lebuhn publicou um estudo morfológico com cerca de 1000 espécies, seguindo o conceito semelhante ao inicialmente utilizado por Carl Clawson Epling em 1936, que resultou no reconhecimento de 17 espécies do gênero *Minthostachys* (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001; SCHMIDT-LEBUHN, 2008).

Estudos etnobotânicos revelaram os diversos usos populares atribuídos às espécies da *Minthostachys*. Por exemplo, a *Minthostachys verticillata* apresentou-se como carmativa, digestiva e antiespasmódica. A *Minthostachys mollis* ou *Minthostachys spicata* apresentou efeitos antimicóticos, antiparasitários, indutores de menstruação, sedativo e contra infestações por pulgas, diarreia, cólicas, reumatismo e doenças respiratórias. Em sua maioria, estes efeitos são atribuídos à presença dos compostos majoritários mentona, pulegona, carvacrol e carvona, que atuam como

digestivos, carminativos, antiespasmódicos, antitússígeno e antimicrobiano (SCHMIDT-LEBUHN, 2008; GUERRA *et al.*, 2007; SORCE; LORENZI; RANALI, 1997).

A espécie *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling (Figura 5), popularmente conhecida como *Arosh Munã* e *Munã* é espécie silvestre que cresce espontaneamente ao longo das estradas e encostas em todo Andes. Suas folhas são usadas como condimento em alimentos e para proteger e armazenar culturas, como as de batata, contra danos causados por pragas e insetos. Quando usadas topicamente, possuem efeitos contra a sarna, micro-organismos e parasitas. Na medicina popular, o chá preparado com suas folhas possui efeito digestivo, antidiarreico, vermífugo, antiespasmódica e contra infecções respiratórias (SENATORE, 1998; HOLGUÍN, 2005).

Com relação ao óleo essencial da *Minthostachys setosa*, estudos indicaram a presença dos compostos majoritários mentona, isomentona e pulegona. Num estudo para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), a pulegona apresentou concentrações entre 0,008 e 0,016 mg/mL enquanto o óleo essencial da *Minthostachys setosa* 0,004 e 0,028 mg/mL. Assim, sua atividade biológica associada ao seu odor mentolado o torna alvo de interesse para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas (SENATORE, 1998; PINTO, 2010).

2.1.2 *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum

A espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum pertence à família Myrtaceae. Presente em regiões tropicais e subtropicais esta família é uma das mais representativas e importantes da flora brasileira, devido as suas propriedades medicinais. Quanto as suas características: são lenhosas; se apresentam na forma de árvores ou arbustos com flores geralmente brancas (raramente rosa, avermelhado, ou arroxeadas) e actinomorfas, que podem ser divididas em partes iguais; possuem folhas geralmente opostas, simples, com pontos translúcidos que denotam a presença de grande número de cavidades secretoras de óleos essenciais. Essa família possui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies, sendo encontrados no Brasil 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies que ainda não foram estudadas em sua totalidade (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001; PAULA *et al.*, 2010).

Dentre os gêneros desta família destacam-se *Myrciaria* O. Berg, *Eugenia* L. e *Psidium* L., que possuem numerosas espécies frutíferas exploradas comercialmente para o consumo ou como matéria-prima da indústria alimentícia. Por exemplo, as espécies *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, *Eugenia uniflora* L e *Psidium guajava* L que correspondem respectivamente à jabuticabeira,

pitangueira e goiabeira. Essas espécies representam apenas uma pequena fração do grande potencial econômico da família Myrtaceae, tendo em vista o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies não comerciais. No entanto, algumas espécies estão extintas ou ameaçadas de extinção, como por exemplo, a *Psidium luridum* (Spreng.) Burret vulnerável de extinção no estado de São Paulo e a *Campomanesia prosthecesepala* Kiaersk provavelmente extinta no estado de Minas Gerais, como divulgadas pela Fundação Biodiversitas, centro brasileiro de referência no levantamento e aplicação do conhecimento científico para a conservação da diversidade biológica (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; BIODIVERSITAS, 2013a, 2013b, 2013c).

Outro importante gênero da família Myrtaceae é o da Pimenta que, possui 14 espécies no Caribe e uma única espécie no Brasil, a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Figura 6) com três variedades: var. *pseudocaryophyllus*; var. *fulvescens* (DC.) Landrum; e var. *hoehnei* (Burret) Landrum. Esta espécie é nativa do Brasil e endêmica nas regiões Sudestes e Sul do Brasil sob o domínio fitogeográfico da Mata Atlântica. Apresentam flores principalmente de dezembro a outubro e os frutos podem amadurecer em quase todos os meses do ano. O odor picante é uma característica compartilhada entre outras espécies do gênero Pimenta, porém, possui sementes duras diferentemente das outras espécies (LANDRUM, 1986; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; SOBRAL *et al.*, 2010).

Figura 6 - Partes aéreas da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes). (A) Quimiotipo Canénia. (B) Quimiotipo Cataia. (C) Quimiotipo Morro Grande. Fotos concedidas pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

A *Pimenta pseudocaryophyllus* é popularmente conhecida como pau-cravo, craveiro-domato, louro-cravo ou chá-de-bugre. Suas folhas são utilizadas na culinária e na produção de

refrigerantes, cachaça e chás para tratamento da gripe ou como calmantes, reguladores da digestão e menstruação. Com relação ao seu óleo essencial, Lima e colaboradores (2006) e Custódio e colaboradores (2010) verificaram uma expressiva atividade antimicrobiana com o valor de CMI em torno de 0,04 mg/mL. Dentre seus compostos majoritários destacam-se os fenilpropanoides, metil-eugenol e eugenol, utilizados como aromatizantes, fragrância, antisséptico, analgésico e antimicrobiano nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (COSTA, 2000; PAULA *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2009). Ainda, segundo o estudo de revisão de Jaganathan e Supriyanto (2012) são atribuídas ao eugenol as atividades biológicas como: antioxidante; antimutagênica; antigenotóxica; anti-inflamatório; e anticancerígena, como indutora de apoptose no melanoma, tumores da pele, osteossarcoma e leucemia.

2.1.3 *Drimys brasiliensis* Miers

A espécie *Drimys brasiliensis* pertence à família Winteraceae que são distribuídas em ambientes florestais úmidos do hemisfério sul. Correspondem a plantas lenhosas, com folhas inteiras e flores terminais com diversas pétalas. A característica desta família é a ausência de xilema, responsável pelo transporte de seiva bruta (solução aquosa de sais minerais) e pela função mecânica de sustentação. A espécie *Drimys brasiliensis* é a única dentre as angiospermas dicotiledôneas da flora brasileira com ausência dos elementos vasculares (FEILD; BRODRIBB; HOLBROOK, 2002; ABREU, 2002; OLIVEIRA; AKISUE, 2009).

Com relação ao número de gêneros presentes na família Winteraceae, Abreu (2002) observou divergência entre os pesquisadores que citam a existência de sete ou seis gêneros. Em outros estudos realizados por Feild e colaboradores (2002) descrevem a existência de cinco gêneros da família Winteraceae: *Pseudowintera*; *Takhtajania*; *Tasmannia*; *Zygogynum*; e *Drimys*. Esses estão distribuídos em florestas da Austrália, Nova Guiné, Malásia, Filipinas, Nova Zelândia e América do Sul. Em especial, o gênero *Drimys* apresenta cerca de seis espécies e sua distribuição geográfica contempla representantes no México, Filipinas, Tasmânia, Chile, Argentina, Venezuela e Brasil (FEILD; BRODRIBB; HOLBROOK, 2002; MARIOT, 2008).

Em território brasileiro, o gênero *Drimys* possui domínios fitogeográficos que compreendem florestas da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Dentre as espécies brasileiras deste gênero estão a *Drimys angustifolia*, *Drimys roraimensis* e *Drimys brasiliensis*. Essa última mostrada na Figura 7 tem distribuição geográfica que compreende a região sul, sudeste e os

estados da Bahia e Distrito Federal, sendo popularmente conhecida como: cataia; copororocapicante; carne-de-anta; melambo; paratudo; pau-para-tudo; canela-amarga; pau-casca-de-anta; cataeira; caá-tuya que em tupi-guarani significa árvore-para-velho; e casca d'anta ou casca-de-anta (MELLO-SILVA, 2010; ABREU *et al.*, 2005).

Figura 7 - Inflorescência da *Drimys brasiliensis*. Foto concedida pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

O nome popular casca-d'anta está relacionado ao uso das cascas da árvore da *Drimys brasiliensis* pelas antas, da espécie *Tapirus americanus*, quando estão doentes. Historicamente, a casca das espécies *Drimys* é também conhecida como “casca de Winter” em homenagem ao capitão e médico Winter, que em 1557 a utilizou casualmente na sua tripulação para o tratamento de uma epidemia de escorbuto. Assim, o sucesso alcançado com a eliminação da epidemia conferiu grande fama ao produto, que passou a ser exportado em larga escala para a Europa. No decorrer dos anos, verificou-se o uso desta casca pela população como condimento culinário, devido as suas características aromáticas (ABREU, 2002; SIMONI, 2011; MARIOT, 2008).

O aroma característico da espécie *Drimys brasiliensis* deve-se a rica presença de óleos essenciais em suas folhas, flores, frutos e casca. Dentre os compostos majoritários, destacam-se os monoterpenos, sequiterpenos e fenilpropanoides responsáveis por potenciais efeitos biológicos incluindo as atividades, anti-inflamatória, antialérgica, anti-hiperalgésica, antinociceptiva (ou analgésica), antibacteriana, antifúngica, anti-leishmaniose, anti-trippanossoma e letal para carrapatos de gados e cachorros. Estudos etnobotânicos revelaram que a espécie é popularmente utilizada

como estimulante, antiespasmódica, antidiarreica, e contra hemorragia uterina. Indicados em distúrbios do trato digestivo e como antitérmico são comercializados sob as formas de tintura e elixir em formulações farmacêuticas (MALHEIROS *et al.*, 2005; LIMBERGER *et al.*, 2008; MARIOT, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; SIMONI, 2011; LAGO *et al.*, 2010; CORRÊA *et al.*, 2011).

O óleo essencial da *Drimys brasiliensis*, assim como das plantas *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Minthostachys setosa* apresentam composição química que permitem efeitos biológicos pertinentes não só para uso em medicamentos, mas também como candidatos a utilização em formulações cosméticas. Entretanto, antes de serem incorporadas em formulações, devem ser testados ainda quanto aos outros efeitos e principalmente, quanto a sua segurança.

2.2 Métodos alternativos de avaliação da segurança e eficácia aplicados em cosméticos

Os produtos cosméticos “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”, de acordo com a RDC nº 211/2005 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2005). Ressalta-se que, assim como os produtos acabados os ingredientes cosméticos devem ser avaliados quanto à segurança, por meio dos ensaios de toxicidade (ANVISA, 2003).

Historicamente, o início da discussão sobre o uso de animais em ensaios de toxicidade e eficácia foi com a publicação do livro *Principles of Human Experimental Technique* em 1959, seguida dos movimentos de proteção aos animais. A partir deste episódio, fica estabelecido o princípio dos 3R's - *Refinement*, *Reduction* e *Replacement* - que, possibilitou a união dos pesquisadores e defensores do bem-estar animal em torno de um objetivo comum: encontrar alternativas cientificamente válidas para os testes feitos em animais (RENAMA, 2013).

Representando o planejamento do ensaio *in vivo*, o *Refinement* ou Refinamento, promove o alívio ou minimização da dor e o estresse dos animais; *Reduction* ou Redução responsável pela diminuição no número de animais utilizados para obter a mesma qualidade de informações dos testes clássicos *in vivo*; *Replacement* ou Substituição estabelece que, um determinado objetivo

seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos (RUSSEL; BURCH, 2009). Baseado nesse conceito surge o termo “métodos alternativos”.

Segundo o artigo 2 do Decreto nº 6.899/2009, métodos alternativos correspondem a procedimentos validados e aceitos internacionalmente, os quais garantam resultados reprodutíveis aos ensaios *in vivo*. A substituição pode ocorrer desde que sejam: a) eliminados animais, ou se necessário em menor número, mas evitando ou diminuindo o seu desconforto; b) utilizados espécies de ordens inferiores; c) utilizados sistemas orgânicos *ex vivo* (BRASIL, 2009).

O uso de métodos alternativos para a avaliação da eficácia e segurança justifica-se evidentemente, quando os resultados são equivalentes aos obtidos nos testes clássicos *in vivo*. Visto que, há dificuldade no emprego de métodos substitutivos aos animais por não possuírem, muitas vezes, sistemas complexos semelhantes ao ser humano. Desta forma, há necessidade da aplicação do conjunto de métodos alternativos cientificamente validados, cujos resultados devem apresentar mesmos níveis de confiabilidade, em relação aos obtidos com os modelos em animais (ANVISA, 2003; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2007).

Quanto à avaliação da segurança de produtos cosméticos no Brasil é responsabilidade do fabricante, do importador ou do responsável pela colocação do produto no mercado, o emprego de recursos técnicos e científicos capazes de reduzir possíveis danos aos usuários, por meio dos ensaios de toxicidade que são realizados na fase de desenvolvimento ou no produto final, quando ocorre a alteração de determinado componente da formulação. Em geral os cosméticos apresentam inocuidade, pois os efeitos tóxicos são potencialmente ausentes, fator este, refletido pela baixa toxicidade dos ingredientes ou pela efetividade da pele em prevenir a absorção de substâncias exógenas. Adicionalmente, os ingredientes devem ser incorporados na formulação com níveis de concentração que apresentem uma margem de segurança (ANVISA, 2003; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A margem de segurança (MS) é definida (Equação 1) como a relação entre a dose experimental mais elevada (NOAEL - *no observed adverse effect level*) que não produz efeito sistêmico adverso, e a dose diária absorvida a qual o consumidor pode ser exposto por via cutânea (DS). Segundo *World Health Organization* (WHO), o valor da MS não deve ser menor que 100 (ANVISA, 2003; SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY (SCCS), 2010).

$$MS = \frac{NOAEL}{DS} \quad \text{Equação (1)}$$

Os resultados da MS, calculados por meio de testes *in vivo*, são extrapolados ao nível da dose em humanos saudáveis e sensíveis (SCCS, 2010). Assim, o Guia de Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos recomenda a análise desse índice para ingredientes, além dos estudos básicos de: absorção cutânea; toxicidade oral aguda; mutagenicidade; alergenicidade; irritação primária da pele e ocular. O Guia indica também estudos complementares de: toxicidade subaguda; irritação por efeito acumulativo; teratogenicidade; carcinogenicidade; genotoxicidade; e toxicidade reprodutiva. Destaca-se que, para produtos acabados são recomendadas as avaliações dos potenciais alergênicos e irritantes, por meio dos testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos (ANVISA, 2003).

Os ensaios *in vivo* de toxicidade reprodutiva, de desenvolvimento e de doses repetidas devem ser realizados, pois, não existem testes *in vitro* validados nem propostas relevantes de pré-validação/validação (SCCS, 2010). Corroborando a essa circunstância, o Guia de Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos considera também que, os testes *in vivo* devem ser realizados somente quando não existam métodos alternativos validados que os substituam ou, após *screening* com métodos *in vitro* e/ou matemáticos válidos (ANVISA, 2003). A pena para o descumprimento dessa condição, ainda que para fins didáticos ou científicos, acarretará em detenção de três meses a um ano e multa; caso ocorra morte do animal a pena é aumentada em até um sexto de acordo com a Lei Federal nº 9.605/1998 em seu artigo 32 (BRASIL, 1998).

Frente a esta preocupação em zelar pela ética na utilização de animais em pesquisa e ensino, e sempre que possível, a aplicação dos métodos alternativos, a Lei Federal nº 11.794/2008 estabeleceu procedimentos e critérios para utilização de animais. Conhecida como “Lei Arouca” em homenagem ao seu idealizador, o sanitarista e deputado Sérgio Arouca, esta Lei foi sancionada após 13 anos de tramitação no Congresso Nacional (BRASIL, 2008).

Ressalta-se que a Lei Arouca gera polêmica em vertentes da comunidade científica e sociedades protetoras dos animais, que classificam o artigo 1 desta Lei como retrógrado, por permitir o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica. Convergindo aos interesses econômicos das instituições que utilizam animais em pesquisas, além das indústrias médica, cosmética e farmacêutica. Facilitando desta forma, a vinda de indústrias internacionais ao território brasileiro por aqui encontrarem leis menos proibitivas à experimentação animal, quando comparadas às leis internacionais, principalmente as europeias.

Contrariamente a essas manifestações o Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (MCTI) afirma que as leis, decretos e portarias atuais zelam pela ética na experimentação animal. Como por exemplo, a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA), descrito no artigo 4 da Lei Arouca e regulamentada pelo Decreto nº 6.899/2009, além da criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) por meio da Portaria MCTI nº 491/2012 (BRASIL, 2012).

O credenciamento das instituições que utilizem animais em seus trabalhos é responsabilidade do CONCEA assim como, elaborar normas brasileiras de criação e uso de animais de laboratório, monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam o uso de animais no ensino e na experimentação (BRASIL, 2009). Dentro deste contexto a RENAMA, por meio de uma rede de laboratórios associados tem por objetivos: estimular a aplicação de ensaios alternativos ao uso de animais; incentivar e monitorar a implantação do sistema de qualidade laboratorial; promover o desenvolvimento, a certificação e a validação de novos métodos alternativos ao uso de animais (BRASIL, 2012).

O processo de validação dos métodos alternativos propostos e/ou desenvolvidos pela RENAMA ocorrerá no âmbito do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), como descrito no artigo 4 da Portaria MCTI nº 491/2012 (BRASIL, 2012).

Ressalta-se que os métodos alternativos validados e os princípios de boas práticas de laboratório, são pautados em metodologias preconizadas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Atualmente com sede na França, a OECD é uma organização intergovernamental responsável por coordenar e harmonizar as políticas, discutir questões de interesse mútuo, e trabalhar em conjunto para responder aos problemas internacionais (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 34, 2005). Destaca-se que, a organização iniciou em 1960 com apenas vinte países desenvolvidos da Europa e América do Norte, que assinaram a *Convention on the Organisation for Economic Co-operation and Development*. Desde então, mais 14 países dos demais continentes se tornaram membros da organização (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2013).

A contribuição de diversos países para diminuir o uso e o sofrimento de animais em ensaios biológicos segue em aumento crescente. Em 1984, o Governo Britânico concedeu fundos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o *European Committee for Validation of Alternative Methods* (ECVAM), instituição da Comissão Europeia encarregada de promover e validar técnicas e métodos destinados à substituição dos ensaios em animais. Algumas instituições, como *Cosmetic*,

Toiletries and Frangrance Association (CTFA), Interagency Regulatory Alternatives Group (IRAG), Food and Drug Administration (FDA), European Cosmetics Association (COLIPA), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), International Cooperation on Alternative Methods (ICATM), Alternatives to Animal Testing da John Hopkins University e Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical (REACH) são referências para acelerar a padronização e a harmonização de métodos alternativos (ANVISA, 2003; OECD 34, 2005; OECD, 2013; FUND FOR REPLACEMENT OF ANIMAL MEDICAL EXPERIMENTS, 2013).

Como marco regulatório dos métodos alternativos, destaca-se a 7th *Amendment to the Cosmetics Directive 2003/15/EC* que, proíbe o uso de animais a partir do ano de 2013 em testes para ingredientes e/ou produtos cosméticos. A Diretiva assegurava, portanto, a circulação na Comunidade Europeia de produtos cosméticos livres de experimentação animal, e com segurança garantida aos consumidores (EC, 2003).

Considerando a importância dos produtos e ingredientes brasileiros no mercado europeu de cosméticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda o uso de métodos alternativos validados, tais como: Permeação e Retenção Cutânea, OECD 428; Irritação cutânea, OECD 439; Irritação ocular vascularização (Het-Cam – não validado pela OECD, porém validado pela ICCVAM); Irritação ocular opacidade/permeabilidade, OECD 437 e OECD 438; Corrosividade cutânea, OECD 430 e OECD 431; Fototoxicidade (OECD 432); Citotoxicidade (OECD/GD 129, 2010). Adicionalmente, o Teste do Micronúcleo *in vitro* (OECD 487) é recomendado pela agência para complementar as informações toxicológicas dos ingredientes cosméticos (ANVISA, 2003; RENAMA, 2013; NON-ANIMAL METHODS FOR TOXICITY TESTING, 2013; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2013a, 2013b).

A quantidade de estudos realizados em ingredientes cosméticos poderá contribuir para a formação de um banco de dados toxicológico, refletindo garantia de segurança ao consumidor. Assim, este banco de dados atuaria de forma incisiva, ao evitar a duplicação desnecessária de trabalho com animais. Dentre estas informações, os métodos alternativos seriam favorecidos com o uso de: recursos matemáticos e de informática, estudos sobre matérias-primas, técnicas físico-químicas, culturas de órgãos, de tecidos e de células (ANVISA, 2003; SCCS, 2010).

2.2.1 Cultura de linhagens celulares eucariontes

O uso da cultura de células eucariontes como um modelo da função fisiológica *in vivo* frequentemente é criticado, pois, essas podem sofrer alterações devido às influências de microambiente *in vitro*. Dentre essas influências, destacam-se: a natureza da superfície em que as células crescem; o grau de contato entre as células; a composição do meio de cultura; a concentração de gases, dióxido de carbono e/ou oxigênio; e a temperatura de incubação. Entretanto, permite a investigação de uma única variável de forma precisa, desde que se utilizem sistemas controlados, livre de interferências externas, e somados ao conhecimento da morfologia e do metabolismo da célula eucarionte (MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005; FRESHNEY, 2010).

2.2.1.1 Células eucariontes

Consideradas como as principais unidades da vida, as células são classificadas em procariontes e eucariontes. Diferentemente das células procariontes, as eucariontes, encontradas em organismos multicelulares complexos, apresentam no citoplasma organelas (Figura 8A) envolvidas por membranas interna, com exceção do citosol (Figura 8B). As organelas estão presentes na maioria das células e são responsáveis pelo crescimento e metabolismo celular. Dentre elas as principais são: os peroxissomos, pequenas vesículas que geram e degradam o peróxido de hidrogênio; o aparelho (ou complexo) de Golgi, responsável pelo transporte e maturação de vesículas da via secretora; retículo endoplasmático liso e o rugoso sintetizam lipídios e glicoproteínas; as vesículas, responsáveis pela endocitose e exocitose de substâncias; o núcleo celular, que armazena o ácido dioxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*), é envolvido por duas membranas que formam o envelope nuclear; os lisossomos, que são sacos membranosos de enzimas hidrolíticas, conduzem a digestão intracelular; e a mitocôndria (ALBERTS *et al.*, 2011; LODISH *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004).

Figura 8 - (A) principais organelas envolvidas por membranas internas: peroxissomo; aparelho de Golgi; retículo endoplasmático; vesícula; envelope nuclear; lisossomos e mitocôndrias na célula eucariote. (B) localização do citosol, marcado em azul, sendo delimitado pela membrana plasmática. Fonte: ALBERTS *et al.*, 2011

As mitocôndrias responsáveis pela respiração celular, ou seja, produção de ATP (adenosina trifosfato) derivada da oxidação de açúcares e ácidos graxos, contêm seu próprio DNA, ácido ribonucleico (RNA *ribonucleic acid*) e ribossomos que permitem a sua auto-reprodução e síntese de proteínas. São organizadas em quatro compartimentos independentes, sendo esses: a matriz mitocondrial, responsável pelo ciclo do ácido cítrico, oxidação do piruvato e do ácido graxo; a membrana externa que contém as porinas, proteínas responsáveis pela formação de canais; o espaço intermembranas, que possui várias enzimas que utilizam o ATP proveniente da matriz mitocondrial; e a membrana interna, que possui proteínas as quais conduzem reações de oxidação da cadeia de transporte de elétrons (ALBERTS *et al.*, 2011).

Dentre os mecanismos de transporte de elétrons das mitocôndrias, o complexo citocromo-oxidase atua ao final da cadeia respiratória transferindo elétrons para a molécula de oxigênio, gerando água. Ressalta-se que, o oxigênio possui alta afinidade por elétrons e uma vez que o adquira, ele forma o radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) que pode causar danos e/ou morte celular. Frente a essa problemática, o complexo citocromo-oxidase tem como principal função se ligar covalentemente a molécula de oxigênio até que, os elétrons necessários para convertê-lo em moléculas de água estejam disponíveis, evitando assim, o ataque dos radicais superóxidos ao DNA, às proteínas e membranas celulares (ALBERTS *et al.*, 2011; VUKOTIC *et al.*, 2012).

As membranas celulares, barreiras altamente seletivas, são divididas em membrana plasmática e membrana interna que atuam respectivamente, como delimitadoras da célula e de organelas. Independente da sua localização, todas as membranas são compostas por proteínas específicas e uma bicamada lipídica. Conceitualmente, os lipídios possuem características

anfipáticas, ou seja, hidrofílicas e hidrofóbicas, e dentre as principais classes dos lipídios de membrana destacam-se: os fosfolipídeos, os glicolipídeos e os esteróis. As proteínas específicas de membrana constituem cerca de 50 % da massa das membranas plasmáticas, sendo classificadas conforme a sua função, tais como: as receptoras, que recebem sinais químicos extracelulares e os transportam para o interior da célula; as âncoras, responsáveis pela ancoragem de macromoléculas; as enzimas, que catalisam reações específicas; e as transportadoras, que permitem a passagem de nutrientes, metabólitos e íons através da membrana (ALBERTS *et al.*, 2011; DOHERTY; McMAHON, 2008).

Associada a membrana plasmática, as junções celulares permitem a conexão entre duas células epiteliais, formando o tecido epitelial. Denominados como epitélio estratificado, encontrado na pele, ou como epitélio simples, que reveste o intestino, possuem respectivamente muitas células de espessura ou apenas uma camada de células. Quanto à morfologia, são formados pela superfície apical, exposta ao ar ou a líquidos aquosos, e a superfície basal que é sustentada pela lâmina basal, uma camada fina e resistente. Essa sustentação ocorre por meio das junções intercelulares, em especial os hemidesmossomos que ancoram as células na lamina basal. Outras junções celulares merecem destaque, dentre elas: as junções do tipo fenda (ou *gap*) que permitem a passagem de pequenas moléculas para o citosol; e os desmossomos, junções aderentes e ocludentes responsáveis pela vedação entre as células são formadas por caderinas, proteínas dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e mediadoras na adesão célula-célula (FRESHNEY, 2010; ALBERTS *et al.*, 2011).

Adicionalmente, a interação entre as células e a alteração da forma das membranas ocorre devido à interface entre a membrana celular e o citoesqueleto. Com as funções de motilidade e de sustentação celular, o citoesqueleto é constituído por microtúbulos, filamentos de actina (ou microfilamentos) e filamentos intermediários. Considerados resistentes, porém flexíveis, os filamentos intermediários revestem a membrana nuclear. Os filamentos de actina revestem internamente a membrana plasmática, tornando-os responsáveis pela forma e movimento celular. Formadores de cílios e flagelos, os microtúbulos são responsáveis pela organização celular, pois, juntamente com o centróssomo, formam sistemas de vias dentro da célula onde as organelas e outros componentes celulares são transportados durante a divisão celular (LODISH *et al.*, 2002; ALBERTS *et al.*, 2011; DOHERTY; McMAHON, 2008).

Diferentemente das células germinativas que, durante a duplicação do seu conteúdo genético e divisão celular sofrem meiose para a formação dos gametas, as células somáticas tem uma sequência de fases do ciclo celular, a mitose e a interfase. Com exceção da **fase G₀** (G de *gap*,

intervalo) que corresponde à dormência no crescimento celular, a **interfase** (Figura 9 e Figura 10A) é um período de intenso metabolismo celular que antecede a mitose, sendo dividida em: **fase G₁**, onde ocorre ativação metabólica e os cromossomos, em número diploide (2n) nos seres vertebrados, são descondensados; **fase S**, (S de síntese), responsável pela replicação do DNA e do centrôssomo; **fase G₂**, que ocorre o crescimento celular e a síntese de proteínas responsáveis pela fase mitótica (ALBERTS *et al.*, 2011; ALMEIDA, 2005).

Figura 9 – Interfase do ciclo celular, quando a célula aumenta de tamanho, os cromossomos são descondensados e os centrôssomos e o DNA são duplicados. Fonte: ALBERTS *et al.*, 2011

A mitose, ou **fase M**, consiste no mecanismo da divisão igualitária do genoma, que contém a informação genética total da célula. Para concluir a divisão é necessária a formação de uma estrutura temporária de eventos, durante a distribuição do material genético. Como parte desses eventos da mitose, destacam-se os subestágios (Figura 10): **prófase** (Figura 10B), onde ocorre a condensação dos cromossomos replicados; **pró-metáfase** (Figura 10C), que inicia o rompimento do envelope nuclear; **metáfase** e **anáfase** (Figura 10D e Figura 10E) são responsáveis respectivamente, pela ordenação dos cromossomos e o movimento de cada cromátide para os lados opostos da célula; **telófase** (Figura 10E), em que ocorre a formação de novo envelope nuclear em torno dos cromossomos, resultando em dois núcleos; **citocinese** (Figura 10F), o citoplasma é dividido em dois por um anel contrátil de actina e miosina, dando origem a duas células-filhas, cada uma com um núcleo (ALMEIDA, 2005; ALBERTS *et al.*, 2011; BURKE; ELLENBERG, 2002; LODISH *et al.*, 2002).

Figura 10 - Fotomicrografia de imunofluorescência do ciclo celular de células renais normais de rato. Os cromossomos foram corados em azul, os microtúbulos em vermelho e o envelope nuclear (EN) em verde. (A) **interfase**, presença de um suave aro nuclear; (B) **prófase**, com invaginações do EN e condensação dos cromossomos; (C) **pró-metáfase**, o envelope nuclear é fragmentado; (D) **metáfase**, em que ocorre o alinhamento dos cromossomos e dispersão do EN; (E) **anáfase** e **telófase**, ocorrem segregação dos cromossomos e formação do novo EN; (F) **citocinese**, com maturação das células-filhas. Fonte: BURKE; ELLENBERG, 2002, adaptada pela autora

O ciclo celular tem a duração de 10 a 20 horas, dependendo do desenvolvimento e do tipo de célula. Nesse período, um grupo de proteínas-cinases, sinais extracelulares e programas intracelulares, são responsáveis por controlar a sobrevivência, crescimento e proliferação celular. Todos esses processos celulares e seu entendimento são ferramentas importantes que, contribuem na aplicação de metodologias quando da utilização em culturas de células (ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2011).

2.2.1.2 Cultura de linhagens celulares eucariontes

O uso da cultura de células foi apresentado à comunidade científica em 1907, pela publicação intitulada *Observations on the Living Developing Nerve Fiber*, de autoria do biólogo e anatomista Ross Granville Harrison, da *Johns Hopkins University*. Nesse estudo, Harrison emergiu o tubo medular de um embrião de sapo em frasco, que continha a linfa fresca deste anfíbio, e posteriormente o tampou e selou com parafina. Após alguns dias, visualizou ao microscópio a proliferação de células nervosas oriundas do tubo medular. Pela primeira vez, foi comprovado que o uso de condições assépticas permitia o cultivo de tecidos por algumas semanas. A partir desse marco, houve um aumento nos interesses em pesquisas na arte da cultura de células por renomados cientistas (NICHOLAS, 1961; CURI; MARTINS, 2005).

Na década de 1950, o cientista George Otto Gey da *University of Pittsburgh*, descobriu que as células cancerosas em cultura, diferentemente das células normais, se multiplicavam indefinidamente desde que, houvesse espaço e uma fonte inesgotável de alimento. A célula protagonista desta descoberta foi denominada HeLa, em homenagem à doadora **Henrietta Lacks**. Essas células, obtidas a partir de células do tumor cervical da doadora, foram mantidas em meio de cultura que simulava as condições de um corpo vivo. Assim, iniciou-se a era áurea de cultura celular permitindo o grande desenvolvimento em pesquisas e envolvendo o milionário mercado das indústrias farmacêuticas. Dentre as contribuições relevantes dessa era estão: o aprimoramento de técnicas de manipulação assépticas; o desenvolvimento de equipamentos e materiais específicos, como o frasco de cultivo ideal; o uso de uma matriz de colágeno nas culturas de células; e outras ferramentas (SKLOOT, 2011; FRESHNEY, 2010, MASTERS, 2002).

O conjunto dessas ferramentas permitiram avanços em pesquisas de imunologia que propiciaram o conhecimento da imunossupressão e métodos para destruir as células malignas sem afetar as células normais; importantes no tratamento de rejeição ao transplante e do câncer, respectivamente. O desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) que revelou informações detalhadas sobre o DNA, por Christopher Lengauer. A discussão sobre a bioética envolvida na captação, pesquisa e lucros envolvendo tecidos humanos (SKLOOT, 2011; MASTERS, 2002).

Apesar da grande evolução das pesquisas baseadas em cultura celular, ocorreram fatos que colocaram em risco o uso desta técnica. Na época, George Otto Gey, determinado a disseminar suas descobertas, doou amostras de HeLa para pesquisadores de diversos países, que as manipularam indiscriminadamente sem condições assépticas adequadas em seus laboratórios. Como

consequência desastrosa a estes fatos, diferentes linhagens celulares foram contaminadas por cepas de HeLa, ocorrendo assim, o maior escândalo envolvendo estas células. Em meio a essa efervescência, nos anos 1960 cientistas recomendaram que o *National Institutes of Health (NIH)* criasse um banco central de células eucariontes referência, as quais deveriam ser testadas, catalogadas e armazenadas. Consequentemente, as células deveriam ser obtidas de culturas celulares submetidas a procedimentos adequados de assepsia e técnicas modernas de esterilização (SKLOOT, 2011).

Atendendo a estas condições, a *American Type Culture Collection (ATCC®)* criou o primeiro banco de linhagens de células eucariontes, pois a entidade distribuía e monitorava a pureza de bactérias, fungos e vírus, desde 1925. Posteriormente, em diversos países foram criados outros bancos de linhagens celulares, tais como: *NIH Stem Cell Unit*, nos Estados Unidos; *Cell Line Data Base (CLDB)* e *Interlab Cell Line Collection (ICLC)* na Itália; *European Collection of Cell Culture (ECACC)* e *United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)* no Reino Unido; *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* na Alemanha; *Japanese Tissue Culture Association (JTCA)*, *Riken Bioresource Center* e *Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)* no Japão; e *The National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations* em Israel (SKLOOT, 2011; MARTINS, 2005; FRESHNEY, 2010).

A credibilidade desses bancos de células aumentou com o mapeamento genético celular que, por meio de novas tecnologias garantem a ausência de contaminação cruzada por outros tipos celulares. Paralelamente, o uso e identificação dos fatores de crescimento proteicos, permitiram a replicação de tipos celulares específicos, utilizados em ensaios *in vitro* validados. Por conseguinte, para que haja reprodutibilidade, na maioria destes ensaios são utilizadas células provenientes de culturas estabelecidas, denominadas linhagens celulares (LODISH *et al.*, 2002; FRESHNEY, 2010).

Com relação à proliferação, as linhagens celulares são classificadas como aderentes e não aderentes (ou em suspensão) que correspondem respectivamente, à necessidade e não de fixação celular, por meio das junções celulares, à base dos frascos de cultura (constituídos por vidros ou plásticos tratados com íons e colágenos ou fibronectinas). As células podem derivar de culturas primárias e de linhagens permanentes. As culturas primárias são chamadas de culturas finitas, provenientes de células normais isoladas de tecidos e possuem tempo limitado de vida. As linhagens permanentes são denominadas imortais ou transformadas, pois, têm a capacidade ilimitada de crescimento em cultura, sendo obtidas a partir de células tumorais e células normais, que sofreram

transformações espontâneas ou induzidas por transfecção e/ou por tratamentos com substâncias carcinogênicas (MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005; FRESHNEY, 2010).

Adicionalmente, a caracterização das linhagens celulares pode ser representada por três fases (Figura 11) segundo Hayflick e Moorhead (1961). A fase I inicia com a cultura primária e termina com a formação de uma camada confluenta de células. Após o descolamento celular é realizado o primeiro subcultivo (ou repique) que, corresponde à primeira passagem celular (P1). Ressalta-se que, no descolamento celular é necessário o uso de proteases e agentes quelantes, como por exemplo, uma solução de tripsina / EDTA (*ethylene diamine tetracetic acid*) responsável pela desagregação da matriz extracelular e pelo desarranjo dos domínios extracelulares das proteínas transportadoras de membrana. Na fase II há um intenso crescimento celular e são realizados diversos subcultivos. Se houverem alterações intencionais ou espontâneas na atividade proliferativa das células, elas se tornam linhagens permanentes; caso não ocorram essas alterações são denominadas linhagens finitas. Finalmente na fase III, as células que não se adaptarem aos intensos repiques ou não sofrerem estas alterações, tornam-se senescentes e morrem (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005; FRESHNEY, 2010).

Legenda: Fase I: corresponde à cultura primária e termina com a primeira confluência celular. Fase II: caracterizada pelo intenso crescimento celular e diversos subcultivos. *Alterações celulares, espontâneas ou intencionais, podem ocorrer em qualquer momento da fase II dando origem às linhagens permanentes, caso não ocorram essas alterações, há a formação das linhagens finitas. Fase III: corresponde às células que entram em senescência seguida de morte.

Figura 11 - Diagrama de evolução de uma linhagem celular, representada pela proliferação celular e a realização de subcultivos ao decorrer do tempo. Fontes: HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005, adaptada pela autora

O perfil da curva de crescimento de células de linhagens finita é dividido em quatro fases: lag, que corresponde ao período de adaptação celular e intensa atividade metabólica; logarítmica (log), que corresponde ao período de máxima multiplicação celular; estacionária (ou *plateau*), em que o número de células mortas é equivalente ao número de células novas; e declínio (ou morte celular), caracterizada pelo relevante aumento de células mortas frente às células vivas. Em linhagem celular permanente (Figura 12) estão presentes apenas as fases lag, log e estacionária do crescimento celular, visto que, as células proliferaram indefinidamente (ALMEIDA; BOAVENTURA, 2005).

Legenda: Lag: corresponde à fase de adaptação celular. Log: é a fase de crescimento celular exponencial. Plateau (ou estacionária), o número de células mortas é equivalente ao número de células novas.

Figura 12 - Curva de crescimento e manutenção de uma linhagem permanente, representada pela concentração de células (células/mL) em função do tempo (dias de subcultura) para serem realizadas as subculturas. Fonte: FRESHNEY, 2010, adaptada pela autora

É importante destacar que a capacidade de proliferação é pré-requisito essencial para que as células não diferenciadas permaneçam em cultura. Porém, alterações espontâneas no fenótipo destas células resultam em diferenciação celular. Assim, com o objetivo de manter as características das células e a reprodutibilidade dos resultados experimentais, faz-se necessário o controle do número de passagens da cultura. A espécie celular, a variação clonal, e as condições de cultura, contribuem para a reprodutibilidade das linhagens finitas, cuja expectativa de vida é limitada em cerca de 20 a

80 passagens, antes da senescência. Entretanto, há particularidades como o limite de passagem da linhagem celular BALB/3T3 clone A31 que deve ser limitada até a P18, para evitar alterações fenotípicas e genotípicas que podem ocorrer com o envelhecimento das culturas. Diferentemente, as linhagens permanentes não se tornam senescentes, desta forma, o número de passagens é contabilizado a partir do último descongelamento celular (MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005; FRESHNEY, 2010; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/GD 129), 2010).

A nomenclatura de uma nova linhagem celular é realizada por meio de códigos, como por exemplo, *NHB*- que se refere à estirpe de células obtidas do cérebro humano normal (ou do inglês *normal human brain*). Caso tenham-se obtido várias linhagens destas células é adicionado um número a esta fonte (NHB1, NHB2, etc.) e se clonadas, deve seguir o número de clones (NHB2-1, NHB2-2, etc.). Adicionalmente, recebem uma nova designação contendo o número de manutenção e adesão ao banco de células ao qual é feito o depósito celular. No entanto, têm-se ocorrido problemas com algumas nomenclaturas, mesmo com este rígido controle na designação preconizado por renomados institutos internacionais, tais como *The Wistar Institute*, *National Cancer Institute* e *Sloan-Kettering Institute*. Por exemplo, a designação 3T3 que identifica o tipo de manutenção, confluência celular de 3×10^5 células por 5 cm da placa de Petri a cada 3 dias, resultou em várias linhas celulares denominadas 3T3, 3T3-Swiss, NIH/3T3 e BALB/3T3, considerada a mais popular. No entanto, a sequência da nomenclatura aplicada as derivação de células clonadas, permitiram a exclusividade dos nomes nestas linhagens celulares, tais como 3T3-L1 e BALB/3T3 clone A31 (FRESHNEY, 2010).

Derivada de fibroblastos de embriões de ratos da espécie *Mus Musculus*, a linhagem celular BALB/3T3 clone A31 (Figura 13) foi desenvolvida por Aaronson e Todaro em 1968 e, neste mesmo ano foi depositada por Aaronson na ATCC[®] sob o número CCL-163TM. Com relação às suas características específicas: não são tumorigênicas; crescem aderentes ao frasco de cultura a uma diluição elevada; apresentam uma densidade de saturação baixa; são sensíveis à inibição por contato durante a divisão celular; e são altamente susceptíveis as alterações em cultura pelo DNA oncogênico dos vírus de sarcoma murinho e SV40. O meio de cultura base para esta estas células é o *Dubelcco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com a adição de 10 % (v/v) de *Bovine Calf Serum* (BCF), atualmente comercializado pela Gibco[®] como *Donnor Bovine Serum* (DBS) (TODARO e AARONSON, 1969; AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC), 2013a).

Figura 13 - Fotomicrografia da linhagem celular BALB/3T3 clone A31 em alta densidade. Fonte: ATCC, 2013a

A linhagem de células normais CHO-K1 (Figura 14), cujo número ATCC[®] corresponde a CCL-61[™], são obtidas a partir da biópsia do ovário de hamster chinês adulto, pertencem à espécie *Cricetulus griseus* (PUCK *et al.*, 1958). Os meios de cultura base para estas células são o *Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium* (F-12K) e *Roswell Park Memorial Institute medium 1640* (RPMI-1640), sendo ambos suplementados com 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC), 2013b; RODAS *et al.*, 2008).

Figura 14 - Fotomicrografia da linhagem celular CHO-K1 em alta densidade. Fonte: ATCC, 2013b

Obtidas a partir da pele de embrião humano abortado na 12^a semana de gestação, a linhagem de fibroblastos WS1 (Figura 15) corresponde à designação ATCC[®] CRL-1502[™] (CORFIELD; HAY, 1978) Classificadas como aderentes o meio de cultura recomendado é o *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) ou RPMI-1640, sendo ambos suplementados com 10 % (v/v) de SBF

Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos

ou *Bovine Calf Serum* (BCS) ou SFB (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC), 2013c; MARSDEN; BALLERMANN, 1990).

Figura 15 - Fotomicrografia da linhagem celular CRL-1502 em alta densidade. A imagem foi obtida ao microscópio óptico (Nikon TS-100), no aumento de 10x da objetiva

2.3 Avaliação da Toxicidade *in vitro*

Toxicidade corresponde à capacidade de determinadas substâncias causarem danos aos seres vivos. Essas são classificadas segundo o tempo de resposta como aguda, sub-crônica e crônica; ou conforme a severidade como leve, moderada e severa. As avaliações de toxicidade abrangem ensaios efetuados nas matérias-primas, formulações em desenvolvimento e produtos acabados, aos quais são aplicados testes *in vivo* e/ou *in vitro*. Com relação aos ensaios *in vitro*, avaliação em sistemas de cultura celular, como a citotoxicidade, assume grande importância, por serem sensíveis, reprodutíveis, fáceis de gerenciar e envolverem menor custo (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

2.3.1 Teste de citotoxicidade

Por definição, citotoxicidade corresponde aos efeitos adversos resultantes da interferência nos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e função celular. Estes efeitos podem envolver a integridade da membrana e do citoesqueleto; alterações no metabolismo, na síntese e na degradação ou mesmo na liberação de constituintes celulares ou produtos, na regulação de íons, e na divisão celular (OECD/GD 129, 2010).

Os efeitos descritos têm como consequência, alterações nas funções basais das células - ou seja, através da mitocôndria, a integridade da membrana plasmática, etc. - que pode levar a mudanças sobre as funções específicas do órgão ou a morte do organismo (OECD/GD 129, 2010).

Dentre as causas de morte celular, Kroemer e colaboradores (2009) citam: necrose; apoptose; autofagia; citostase; e cornificação que corresponde às células diferenciadas terminalmente.

Além da morte celular, a avaliação da citotoxicidade pode se pautar em alterações fenotípicas e regeneração celular, quando exposta a um procedimento traumático. O potencial regenerador das células é avaliado pelo crescimento celular e medido por meio de ensaios que avaliem sua atividade metabólica, viabilidade e tamanho celular. Relacionada com a proliferação ou a sobrevivência da célula, a viabilidade celular corresponde a uma resposta imediata ou em curto prazo, como a perturbação de uma via metabólica específica ou o aumento da permeabilidade da membrana (FRESHNEY, 2010).

A ruptura da integridade da membrana é avaliada por meio de efeitos imediatos que não preveem a posterior sobrevivência das células. Estes efeitos são determinados pela entrada de uma substância impermeável como, por exemplo, o corante de células mortas *Trypan Blue*, ou a liberação de um corante adquirido e retido por células vivas, o *Neutral Red* (FRESHNEY, 2010).

O mecanismo de ação do *Neutral Red* (NR) consiste na capacidade das células viáveis em se ligar a esse corante vital. O NR é um corante catiônico fraco (Figura 16), que facilmente se difunde através da membrana celular e se liga eletrostaticamente à matriz aniônica lisossomal. Os agentes tóxicos podem alterar a superfície da célula ou da membrana lisossomal, provocando efeitos que gradualmente se tornam irreversíveis e resultam em morte ou inibição do crescimento celular. Uma vez que a coloração do NR é diretamente proporcional ao número de células vivas, após a exposição à amostra teste, a avaliação da citotoxicidade é dependente das leituras da absorbância do corante na espectrofotometria (BORENFREUND; PUERNER, 1985).

Figura 16 - Estrutura química do corante vital Neutral Red (NR). Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2013a

Adicionalmente, como resposta a perturbação de uma via metabólica, os sais de tetrazólio, componentes ativos dos corantes vitais MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) e WST-1 (5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium) (Figura 17) são

reduzidos à formazana pelo complexo proteico citocromo-oxidase nas mitocôndrias de células viáveis. As propriedades biológicas desses sais são dependentes de suas estruturas químicas, em que o núcleo do anel de tetrazólio possui quatro átomos de nitrogênio, carregado positivamente, está rodeado por três grupos aromáticos. Após redução química, ocorre ruptura do anel de tetrazólio e sua coloração, inicialmente incolor ou fracamente colorida, é transformada em produtos brilhantes de formazanas coloridas (MOSMANN, 1983; BARLTROP; OWEN, 1991; BUTTKE; McCUBREY; OWEN, 1993; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

Figura 17 - Estruturas químicas dos sais de tetrazólio -MTT, XTT, MTS, WST-1 - e o aceitador de elétrons PMS . Fonte: BERRIDGE; HERST; TAN, 2005

As formazanas resultantes do MTT são insolúveis em água, por isso, para ser efetuada a leitura em espectrofotômetro, deve-se adicionar uma solução solubilizante, geralmente de dimetil sulfóxido (DMSO) ou etanol. Na tentativa de superar este inconveniente, foram desenvolvidos os corantes XTT, MTS e WST-1 que, na presença do aceitador de elétrons PMS (*phenazine methosulfate*) produzem formazanas mais intensamente coloridas e solúveis em água, facilitando

desta forma a leitura em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983; BARLTROP; OWEN, 1991; BUTTKE; McCUBREY; OWEN, 1993; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

Berridge e colaboradores (2005) verificaram em células de mamíferos que, os sais de tetrazólio são reduzidos não somente pelo complexo proteico citocromo-oxidase, mas também pelos lisossomos, citoplasma e a membrana plasmática. A carga total positiva em sais de tetrazólio parece ser o fator predominante envolvido na captação desses corantes, através do potencial de membrana celular. As implicações dessas descobertas são discutidas em termos do uso desses sais como, indicadores do metabolismo celular e avaliadores da citotoxicidade.

Os métodos utilizados para a determinação da citotoxicidade podem ser agrupados, conforme definido na ISO 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 2009), em quatro categorias: avaliações da morfologia celular; determinação dos danos celulares; avaliação do crescimento celular; e avaliação de aspectos referentes ao metabolismo celular.

Segundo o guia internacional *In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests*, as etapas básicas de um ensaio *in vitro* de citotoxicidade basal são: solubilizar ou dispersar a amostra em solvente não citotóxico; incubar as células com as amostras durante um determinado período; remover a amostra para a avaliação da viabilidade celular; e calcular os valores da concentração inibitória, *inhibitory concentration* IC (INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM), 2006).

A concentração máxima não tóxica de uma amostra pode ser obtida por meio do cálculo da IC₁₀, que corresponde à concentração que produz 10 % de inibição das células viáveis (CASTELL; GOMEZ-LECHÓN; PONSODA, 2000). Para estimar as concentrações letais da amostra no sangue humano, devem ser calculados os valores de IC₂₀ e da IC₈₀. E o valor de IC₅₀ pode estimar a DL₅₀ correspondente à dose que produz 50 % da letalidade nos animais testados (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH), 2006; ICCVAM, 2006).

A relação entre citotoxicidade *in vitro* e letalidade aguda *in vivo*, permite a determinação das doses de partida para testes de toxicidade oral aguda em roedores. Considerando que, a produção de energia e manutenção da integridade da membrana é semelhante nas células da cultura *in vitro* e do animal (NIH, 2006; OECD/GD 129, 2010).

A credibilidade da relação entre citotoxicidade *in vitro* e letalidade aguda *in vivo*, iniciou-se com a avaliação de 50 substâncias de referência pelo *Multicentre Evaluation of In vitro Cytotoxicity*

(MEIC), criado em 1989 na Escandinávia. Posteriormente, na Alemanha, o *German Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, ZEBET)* e o *Federal Institute for Risk Assessment (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR)* registraram os resultados da citotoxicidade de mais de 340 substâncias num banco de dados. Desde então, ocorre redução no uso de animais, devido à estimativa da DL₅₀ de centenas de substância referências por demais programas e institutos internacionais, tais como: *National Toxicology Program (NTP)*, *National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)* e *Environmental Protection Agency (EPA)* nos Estados Unidos; *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)* na comunidade europeia (BONDESSON *et al.*, 1989; EKWALL, 1999; OECD/GD 129, 2010).

2.3.2 Teste de fototoxicidade

A fototoxicidade é definida pela OECD 432 como “resposta tóxica aguda que é induzida por determinadas substâncias químicas quando aplicadas na pele e posterior exposição à luz, ou que é induzida de forma semelhante por irradiação na pele após a administração sistêmica de um produto químico” (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 432, 2004, p. 15, tradução nossa). O mecanismo básico do ensaio de fototoxicidade pode ser descrito como, a existência ou não do potencial fototóxico de um produto químico induzido por exposição à radiação ultravioleta (UV) e luz visível assim, esse potencial pode ser avaliado pela diminuição da viabilidade celular (SPIELMANN *et al.*, 1998).

Conceitualmente, a radiação é um fenômeno físico de propagação de energia. Isso ocorre, pois, núcleos atômicos muito energéticos tendem a se estabilizar liberando o excesso de energia em forma de partículas, radiações α e β , ou em forma de ondas eletromagnéticas, radiação γ . Ressalta-se que, as partículas possuem massa, carga elétrica e velocidade dependente do valor de sua energia, enquanto as ondas eletromagnéticas, não possuem massa e a sua velocidade independe da energia (CARDOSO *et al.*, 2010).

A energia emitida pela luz solar, corresponde à radiação eletromagnética, constituída por 45 % de radiação UV, 5 % de luz visível e 50 % de radiação infravermelha, sendo seus respectivos comprimentos de onda (λ) de 100 a 400 nm, acima de 400 a 800 nm e acima de 800 nm. O organismo humano reage e detecta a presença destas radiações de diferentes formas. A radiação

infravermelha sob a forma de calor, por meio do aquecimento e dilatação dos vasos sanguíneos; a radiação visível é detectada pelo sistema óptico; e radiação UV por meio de reações fotoquímicas (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2000; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

As reações fotoquímicas envolvendo espécies reativas do oxigênio são resultados da absorção da radiação UV pelos cromóforos na pele - melanina, DNA, RNA, etc. - devido à excessiva exposição à radiação (BALOGH *et al.*, 2011). A radiação UV é naturalmente estressante para a maioria das formas de vida, a destruição da camada de ozônio e o aquecimento global são as principais causas para o aumento da dose de radiação recebida pelo homem. Quando o mecanismo de defesa está alterado, esta radiação penetra na pele resultando em mutações genéticas e comportamentos celulares anormais, devido ao seu menor comprimento de onda (MAHMOUD; MEKKAWY; SAYED, 2009).

A classificação das radiações UV é baseada no λ , sendo UVAI de 340 a 400 nm; UVAIL de 320 a 340; UVB de 280 a 315 nm; e UVC 100 a 280 nm (MATTS, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (WHO), 1996). Adicionalmente, a intensidade e a quantidade de radiação UV incidente sobre uma superfície correspondem a irradiância (W/m^2 ou mW/cm^2) e dose de radiação (J/m^2 ou J/cm^2), respectivamente (OECD 432, 2004).

Segundo Bouillon (2002), a porcentagem de absorção do espectro solar pelas camadas da pele (Figura 18) corresponde a: 0 % dos raios UVC são absorvidos pela pele, pois, possuem baixo λ e são bloqueados pela camada de ozônio; 20 % dos raios UVB são absorvidos na epiderme e 8 % na derme, o restante é bloqueado pela camada córnea; 80% dos raios UVA são absorvidos pela epiderme e 20 % pela derme; 70 % da luz visível são absorvidas na derme, 20 % na hipoderme e menos de 10 % na camada córnea e epiderme; e 65 % dos raios infravermelhos são absorvidos na derme, 15 % na hipoderme e menos de 20 % na camada córnea e epiderme.

Figura 18 - Porcentagem de absorção da radiação solar pelas camadas da pele. Fonte: BOUILLON, 2002, modificada pela autora

Quando a radiação UV é absorvida por uma molécula biológica, um elétron é transferido para níveis de energia mais elevados, resultando em espécies mais reativas, os radicais livres. Essas espécies podem causar morte, alterações cromossômicas e mutações em células procariontes e eucariontes. A radiação UVB é responsável pela transformação do ergosterol epidérmico em vitamina D, entretanto, a exposição frequente e intensa pode suprimir a resposta imunológica da pele e causar danos no DNA manifestados na forma de câncer de pele. A radiação UVA pode também induzir a formação desse câncer dependendo do tipo de pele, da frequência e intensidade de exposição, assim como, formar indiretamente os radicais livres. Entretanto, na literatura foi demonstrado que essa radiação pode aumentar a expressão do gene supressor de tumor p53; induzir a pigmentação da pele por meio do escurecimento da melanina pela fotoxidação da leucomelanina, substância incolor precursora da melanina (WHO, 1996; OEDC 432, 2004; SEITÉ *et al.*, 2000; MATTS, 2006; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; PALM; O'DONOGHUE, 2007).

Enquanto a radiação UVB é altamente citotóxica, a radiação UVA está associada a reações fototóxicas que ocorrem devido à formação de radicais livres em excesso. Por isso, a escolha de uma fonte de radiação apropriada é de extrema importância nos testes de fototoxicidade *in vitro*. Assim, a radiação utilizada nesse ensaio é a UVA que deve, portanto, seguir os requisitos: a dose de luz deve ser suficiente para a detecção da fototoxicidade de produtos químicos de referência recomendados pelo guia da OECD 432; e que a fonte de luz emita radiação com λ tal que seja absorvido pelo produto químico (espectro de absorção) a ser avaliado (OEDC 432, 2004; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

Segundo o guia da OECD 101, "*UV-VIS Absorption Spectra*" (*Spectrophotometric Method*), a substância teste deve ser avaliada, antes do ensaio biológico, quanto ao seu espectro de absorção no UV / visível (UV-VIS), para indicar quais comprimentos de onda podem causar degradações fotoquímicas, que dependem da energia total absorvida. A equação que define o espectro de absorção UV-VIS depende da concentração da amostra (mol/L), caminho óptico, densidade óptica e coeficiente de absorção molar. Por meio desse cálculo é possível determinar a fotorreatividade da amostra, se menor que $10 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ o ensaio de fototoxicidade *in vitro* não deve ser realizado (OECD 432, 2004; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 101, 1981). Frente a esses requisitos, a definição do espectro de absorção UV-VIS dos óleos essenciais não é possível, pois, a obtenção de valores de concentração em mol/L é inviabilizada, por se tratarem de misturas complexas de substâncias.

2.3.3 Teste do micronúcleo *in vitro* (MNvit)

O MNvit é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos no citoplasma das células em interfase, que corresponde a fase do ciclo celular que antecede a mitose. Os micronúcleos, pequenas massas nucleares delimitadas por uma membrana e separadas do núcleo principal, são representantes de danos no DNA transmitidos para as células-filhas. Essas pequenas estruturas, podem ser originadas a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos (ou com falta de centrômero), ou cromossomos inteiros que não migraram para os pólos do fuso durante a anáfase da mitose e que, em seguida foram envolvidos pelo envelope nuclear durante a telófase (Figura 19). Ressalta-se que, os micronúcleos são formados durante a mitose, mesmo que não tenha havido dano cromossômico durante o ciclo. Assim, os danos do DNA causados por determinada amostra serão expressos somente após um ciclo de divisão celular, sendo proporcional ao número de células em processo de divisão durante o teste (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 487, 2010; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2007).

Legenda: MN = micronúcleo

Figura 19 - Formação do micronúcleo durante as fases do ciclo celular, anáfase e telófase. Fonte: FENECH, 2007 adaptado pela autora

O ensaio MNvit detecta micronúcleos produzidos durante ou após a exposição de produtos químicos em células submetidas à divisão celular. As atividades avaliadas são a **clastogênica** ou de dano cromossômico e **aneugênica** (ou aneuploidia celular) que corresponde à mudança com relação ao número normal de cromossomos. É importante destacar que, os micronúcleos analisados são de células em interfase, obtidas de culturas que foram submetidas ou não pela citocalasina B (citoB). Essa substância apresenta como mecanismo de ação ligar-se à actina dos microfilamentos, presente no citoesqueleto, inibindo sua polimerização durante a formação do anel contrátil (Figura 20B). Assim, como consequência há o bloqueio da citocinese, formando então uma única célula com o conteúdo citoplasmático das duas células-filhas (Figura 20A). Em condições normais, a clivagem celular ocorre devido à polimerização e despolimerização dos microfilamentos formando as células-filhas (PARRY; SORS, 1993; FENECH, 2007; LIN; LIN; FLANAGAN, 1978; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 1997).

Legenda: MN micronúcleo

Figura 20 - Culturas celulares não tratadas (A) e tratadas com citocalasina B (B)

Destaca-se que o guia da OECD 487 (2010) permite a utilização de protocolos com e sem citoB, desde que a população de células analisadas tenham sofrido mitose, durante ou depois da exposição à substância teste. Em ambos os protocolos, é importante demonstrar que a proliferação das células ocorreu nas culturas não tratadas (controle de células) e tratadas com a substância teste. O teste de MNvit pode também avaliar a extensão da citotoxicidade ou da citostase baseados no aumento do número de micronúcleos das células, como nos controles positivos (OECD 487, 2010; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2000).

Dentre os controles positivos, destacam-se os agentes clastogênicos e aneugênicos tais como, a radiação ionizante por cobalto-60 e as substâncias químicas preconizadas pela OECD 487 (2010) como a colchicina, mitomicina C e o benzo[α]pireno. O alcaloide colchicina é um agente aneugênico e seu mecanismo de ação consiste em alterar o número de cromossomos, pois impede a formação dos pólos do fuso durante a metáfase da mitose. O alquilante mitomicina C é um agente clastogênico responsável pela alquilação do DNA, atua durante a interfase resultando na inibição

seletiva da síntese de DNA, recombinação e troca de cromátides irmãs. O alquilante benzo[α]pireno é um agente clastogênico responsável pela alquilação do DNA resultando em metabólitos reativos, na diminuição da proliferação celular nas fases S e G2 da interfase e o aumento na expressão do gene p53, em células tumorais ou metabolicamente competentes ativadas pelo reagente S9 (PARRY; SORS, 1993; CARRANO *et al.*, 1979; ALMEIDA *et al.*, 2005; CANOVA *et al.*, 1996; SADIKOVIC; RODENHISER, 2006).

O cofator pós-mitocondrial S9, preparado a partir de fígados de roedores tratados com substâncias de indução enzimática, é responsável por mimetizar o metabolismo de primeira passagem no fígado. O metabolizador exógeno S9, induzido por fenobarbitona e β -naftoflavona, deve ser adicionado à cultura de células com capacidade metabólica inadequada. Caso não seja utilizado esse sistema metabolizador exógeno, deve-se utilizar uma linhagem celular geneticamente modificada para a expressão de enzimas responsáveis pela ativação metabólica, e com a suas atividades clastogênicas e aneugênicas conhecidas cientificamente, como na linhagem MCL-5 (OECD 487, 2010; DOHERTY *et al.*, 1996; JOHNSON; UMBENHAUER; GALLOWAY, 1996).

É importante ressaltar que no teste preconizado pelo guia da OECD 487 *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, a contagem das células e dos micronúcleos é realizada por meio da análise de lâminas. Entretanto, a busca pela automatização do teste do MNvit, principalmente na fase referente à contagem das células, é crescente em diversos grupos de pesquisa. O uso da citometria de fluxo apresenta-se como facilitador durante a contagem das células e dos micronúcleos, devido à rapidez de análise quando comparada ao método clássico de leitura das lâminas ao microscópio óptico.

O citômetro de fluxo é um equipamento que identifica múltiplas características físicas como o tamanho, a granulosidade e a intensidade de fluorescência em partículas individuais. O processo de fluorescência (Figura 21) apresenta as fases de excitação, intermediária, emissão e retorno ao estado fundamental (ou de baixa energia). Inicialmente o átomo em seu estado fundamental é estimulado por um fóton, como o laser, que eleva o elétron da camada externa desse átomo a níveis maiores de energia, na fase intermediária ocorre perda dessa energia em seguida, a emissão de luz devido à dissipação energética causada durante o retorno do elétron ao estado fundamental (HAWLEY; HAWLEY, 2004; SARTORI; LORETO, 2009; CHAPMAN, 2000).

Figura 21 - Fases do processo de fluorescência. (1) fase de excitação; (2) fase intermediária; (3) fase de emissão; (4) fase de retorno ao estado fundamental. Fonte: SARTORI; LORETO, 2009; RAHMAN, 2013, adaptado pela autora

O princípio da citometria de fluxo consiste na detecção da fluorescência de partículas marcadas com fluorocromos, que podem estar conjugados com anticorpos que se ligam a superfície celular, e/ou intracelular e/ou nuclear. O mecanismo de ação desses marcadores consiste em absorver a luz em determinado comprimento de onda (λ) e emitir em outro λ (HAWLEY; HAWLEY, 2004).

As partículas são transportadas por um sistema de fluxo de fluidos e passam individualmente num feixe de laser, que converte esse evento em sinal digital captado e analisado por programa de computador. Dentre os principais componentes de um citômetro de fluxo (Figura 22), destacam-se: recipientes para amostra e **sistema de fluidos**; **sistema óptico** composto por laser e filtros ópticos; **sistema de detectores** para captação dos sinais de acordo com a sua cor; **sistema eletrônico computacional** que converte os sinais luminosos detectados em sinais eletrônicos. O conjunto desses sistemas permite a identificação de partículas (Figura 22) quanto ao tamanho, *Forward Scatter* (FSC) referente à dispersão frontal de luz, e quanto à granulosidade, *Side Scatter* (SSC) que corresponde à dispersão no ângulo de 90° (HAWLEY; HAWLEY, 2004; INVITROGEN, 2013).

Figura 22 - Principais componentes de um citômetro de fluxo e a identificação das partículas quanto ao tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e granulosidade (*Side Scatter* SSC). Fonte: INVITROGEN, 2013 modificada pela autora

A capacidade de analisar simultaneamente múltiplos parâmetros das células corresponde a uma das inúmeras vantagens da citometria de fluxo que, inicialmente na década de 1970 era utilizado para análises de células sanguíneas. Hoje esse ensaio analisa bactérias, vírus, diversas linhagens celulares eucariontes aderentes ou não, cromossomos, núcleos e os micronúcleos, permitindo assim a automatização do teste MNvit (HAWLEY; HAWLEY, 2004; SCHEFFOLD; KERN, 2000).

No ensaio do MNvit por citometria de fluxo, Collins e colaboradores (2008) e Avlasevich colaboradores (2011), utilizaram o kit comercial *Litron in vitro MicroFlow® Kit*, que possui os agentes fluorescentes EMA (*ethidium monoazide*) e SYTOX® Green. A coloração sequencial desses agentes resulta na diferenciação dos micronúcleos e da cromatina de células em apoptose e

necrose. Esse efeito ocorre por meio dos mecanismos de ação dos corantes: EMA que atravessa a membrana comprometida de células apoptóticas e necróticas e se liga covalentemente ao DNA; e SYTOX[®] Green que marca a cromatina de células viáveis.

Baseado nesse princípio, Bryce e colaboradores (2007) também realizaram o ensaio do MNvit por citometria de fluxo, porém não utilizaram esse kit comercial mas, desenvolveram um método baseado também na incorporação desse agentes fluorescentes. Entretanto, em condições que evitassem resultados falso-positivos, com a remoção das membranas citoplasmáticas das células que permitiram a marcação de núcleos livres, em suspensão, e de MN após adição do fluorocromo SYTOX[®] Green.

2.4 Atividade antioxidante intracelular

A atividade antioxidante de uma substância compreende a sua capacidade de reduzir ou bloquear as reações de oxidação causadas por radicais livres, que são moléculas altamente reativas com um elétron não pareado. Embora a redução de quatro elétrons do oxigênio (O₂) pelo complexo citocromo-oxidase, presente nas mitocôndrias, seja quase sempre executada com rapidez e precisão, o O₂ algumas vezes pode ser reduzido apenas de modo parcial produzindo radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ERO, ou ROS de *reactive oxygen species*) que facilmente reagem com diversas substâncias de componentes celulares.

A origem da ERO pode ser endógena que é resultado do metabolismo celular, ou exógeno causado pelas radiações ionizantes, radiação UV e agentes xenobióticos. As principais ERO são distribuídas em dois grupos, os radicalares como a hidroxila (•OH), superóxido (O₂^{-•}), peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•); e os não-radicalares como o oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (VOET *et al.*, 2006; VASCONCENLOS *et al.*, 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O ataque realizado pelos radicais livres às moléculas biológicas é realizado de forma aleatória, dificultando assim a caracterização de seus produtos de reação. Dentre as rotas de ação das ERO em células eucariontes (Figura 23), destacam-se: **peroxidação lipídica**, que rompe as membranas biológicas; **oxidação do DNA**, que pode causar danos e mutações genéticas; **oxidação proteica**, que resultam em perda ou ganho da função proteica, se for perda ocorrerá erro de tradução proteica, se for ganho ocorrerá apoptose celular; **agregação proteica**, esses agregados podem resultar em proteínas tóxicas; **perda de função da proteína FeS**, ocorre desnaturação oxidativa

dessa proteína e liberação de ferro (Fe) ao ambiente celular que, pode acelerar a catálise da Reação de Fenton, em que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com o Fe^{2+} formando o radical $\bullet\text{OH}$ que pode atacar moléculas orgânicas e causar danos celulares (AVERY, 2011; AGUIAR *et al.*, 2007).

Figura 23 - Principais rotas de ação das ERO em células eucariontes. Fonte: AVERY, 2011 adaptado pela autora

A produção de ERO está presente no metabolismo humano e possui algumas funções biológicas pró-oxidantes, como na manutenção da homeostase fisiológica e no mecanismo da fagocitose em que essas espécies são produzidas para combater infecções. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada o organismo, que dispõe de um sistema antioxidante, tenta reestabelecer o equilíbrio. Dentre os agentes antioxidantes destacam-se as **enzimas antioxidantes** (superóxido desmutase, glutathione peroxidase e catalase) e **antioxidantes não enzimáticos** (vitaminas E, C e β -caroteno; glutathione; transferrina; e ácido úrico). No entanto, o estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio do sistema pró e antioxidante com predomínio das ERO que causam danos celulares e ao DNA, doenças e envelhecimento (VASCONCENLOS *et al.*, 2007).

O envelhecimento, apesar de ser um processo multifatorial, pode estar relacionado com os estresses metabólico e oxidativo, resultando na produção de ERO. Ambos os tipo de estresse podem causar danos a vários componentes celulares e desencadear a ativação de vias de sinalização celular específicas, que podem influenciar no desenvolvimento de doenças e no envelhecimento (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Frente a essa problemática, considerando o aumento da expectativa do tempo de vida e a busca pela sua qualidade durante o processo de envelhecimento, estudos são realizados baseando-se nas propriedades antienvelhecimento das substâncias ativas aplicadas em medicamentos e cosméticos. Como uma das funções dos cosméticos é prevenir o envelhecimento cutâneo, as substâncias antioxidantes podem ser formuladas em produtos cosméticos. Indo ao encontro da tendência de uso de produtos naturais, destacam-se os extratos vegetais de chá verde, alecrim, canela, sálvia e tomilho (SCOTTI *et al.*, 2007). Deste modo, a avaliação da atividade antioxidante em nível celular, pode contribuir para a obtenção de produtos cosméticos com maior eficácia antioxidante.

O método de determinação da atividade antioxidante intracelular consiste em avaliar a presença de espécies reativas no interior da célula por meio de uma sonda apolar de **diacetato de diclorofluoresceína** (*2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*) não fluorescente. A sonda após ser incorporada pela célula na presença de enzimas esterases, que catalisam ésteres, resulta na **diclorofluoresceína reduzida**. Assim, a forma reduzida por ser impermeável, fica retida na célula sendo rapidamente oxidada por ERO formando a **diclorofluoresceína** (*2',7'-dichlorofluorescein*) substância altamente fluorescente, que pode ser mensurada em espectrofluorímetro ou citômetro de fluxo (SAUER *et al.*, 2003; ZHANG; ZHAO, 2003; FRADE *et al.*, 2010).

2.5 Dispersão dos óleos essenciais em meio de cultura

A lipossolubidade dos óleos essenciais é fator limitante para a execução de testes que comprovem sua eficácia e segurança. Nos ensaios toxicológicos *in vitro* as amostras de óleos essenciais devem ser dispersas no meio de cultura por substâncias, que apresentem ausência de toxicidade, evitando desta forma interferências falso-positivas nos resultados (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009; ROSEN, 2004). Dentre os solventes dos óleos essenciais em meio de cultura citados na literatura estão o DMSO (dimetil sulfóxido) (VILLA *et al.*, 2009) e o etanol (HAYES *et al.*, 2002; SIVROPOULOU *et al.*, 1997). Entretanto, não há um consenso para o uso de um solvente ideal que possa ser utilizado na dispersão de qualquer óleo essencial em meio de cultura.

A instabilidade dos óleos essenciais em meios de cultura ocorre devido à diversidade dos componentes presentes nestas substâncias. As características apolares dos óleos essenciais e polares dos meios de cultura remetem ao conceito dos sistemas de emulsões, utilizado em Farmacotécnica.

As emulsões, ou macroemulsões, correspondem a dispersões coloidais formadas por uma fase descontínua dispersa (ou interna) e uma fase contínua dispersante (ou externa), sendo estas classificadas nos tipos: água em óleo (a/o); óleo em água (o/a); múltiplas (a/o/a ou o/a/o); e microemulsões (LACHMAN; LIERBERMAN; KANIG, 1986; TAYLOR; ATTWOOD, 2003).

O tipo o/a corresponde à dispersão do óleo em fase aquosa nesse caso, a fase descontínua (ou interna) é o óleo e a fase contínua (ou externa) aquosa. Contrariamente, o tipo a/o é uma dispersão de uma solução aquosa em óleo, a fase interna é a água e a fase externa é o óleo. As emulsões múltiplas são sistemas complexos e heterogêneos em que as emulsões simples (a/o e o/a) coexistem simultaneamente. As microemulsões consistem em dispersões de dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis (o/a ou a/o) que apresentam gotículas que variam entre 100 e 10.000 nm. No entanto, para que ocorra a estabilidade desses sistemas de emulsão, que compreendem a mistura de dois líquidos imiscíveis e termodinamicamente instáveis necessitam da presença de agentes tensoativos (LACHMAN; LIERBERMAN; KANIG, 1986; SANTOS, 2011; TAYLOR; ATTWOOD, 2003; ROSEN, 2004; ROSSI *et al.*, 2007).

Tensoativo consiste em uma substância que, em baixa concentração têm propriedades de adsorver sobre superfícies ou interfaces que correspondem a duas fases não miscíveis do sistema, e de alterar suas energias livres. Provenientes de substâncias naturais ou sintéticas, a característica de sua estrutura química é anfipática (Figura 24), ou seja, corresponde a presença de um grupo apolar (lipofílico ou hidrofóbico) e outro polar (ou hidrofílico). Devido a essas estruturas os tensoativos em presença de água e óleo, adsorvem-se nas interfaces orientando-se de maneira que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase oleosa, reduzindo as tensões interfacial e superficial do sistema (ROSEN, 2004; ROSSI *et al.*, 2006).

Figura 24 - (A) representação de um tensoativo. (B) adsorção e orientação dos tensoativos nas interfaces óleo e água. Fonte: ROSSI *et al.*, 2006 adaptado pela autora

A extremidade lipofílica do tensoativo é normalmente um resíduo de hidrocarboneto de cadeia longa, e com menos frequência apresenta um hidrocarboneto halogenado ou oxigenado, enquanto a extremidade hidrofílica corresponde a um grupo iônico ou altamente polar. Assim, dependendo da natureza do grupo hidrofílico, os tensoativos são classificados como: aniônico, em que a molécula suporta uma carga negativa, por exemplo, o lauril sulfato de sódio (LSS); catiônico, que possui uma carga positiva como o amônio quartenário; zwitteriônico possui cargas positivas e negativas, como representante a sulfobetaina; e não iônico, como os ésteres de sorbitano e o polissorbato, que não possui qualquer carga iônica aparente (ROSEN, 2004; TAYLOR; ATTWOOD, 2003).

Outra propriedade fundamental dos tensoativos é a tendência de formar agregados chamado micelas (Figura 25). Para uma dada concentração específica, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), ocorre uma mudança brusca nas propriedades físico-químicas dos tensoativos. Em valores abaixo da CMC as moléculas de tensoativo estão presentes na forma de monômeros dispersos, em valores acima estas se apresentam na forma de micelas, processo conhecido como micelização (ROSSI *et al.*, 2006).

Figura 25 - Processo de micelização. Fonte: ROSSI *et al.*, 2006

O equilíbrio do tensoativo entre as fases imiscíveis é denominado equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) e representa uma forma de classificação dos tensoativos não iônicos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos. A classificação foi introduzida por Griffin em 1949 e utiliza escala numérica adimensional com valores de 1 a 20, em que os valores de EHL aumentam de acordo com a hidrofília da molécula. Por exemplo: valores de EHL entre 3 e 9 possuem características lipofílicas e atuam como agentes emulsivos a/o; valores de 8 e 9 começam a apresentar características hidrofílicas; e entre 10 e 18 apresentam características hidrofílicas e atuam como agentes emulsivos o/a. Com relação aos valores de EHL e a dispersão em água, destacam-se: valores entre 1 e 3 não dispersam em água e atuam como **agentes antiespumante**; valores de 4 a 6 dispersam em água; de 8 a 10 provocam uma dispersão leitosa instável em água e atuam como **agentes molhantes**; de 12 a 14 resultam em dispersão clara em água e atuam como **agentes detergentes**; de 16 a 18 resultam em dispersão límpida a vista desarmada de óleos em água, sendo considerados **agentes solubilizantes** (GRIFFIN, 1949; SANTOS, 2011; TAYLOR; ATTWOOD, 2003).

Como representante dos agentes solubilizantes o tensoativo não iônico polissorbato 20 (Figura 26), ou monolaurato de polioxietileno sorbitano (20), é uma mistura de ésteres láuricos parciais de sorbitol e seus anidridos copolimerizados (polimerização a partir de mais de um tipo de monômero) com aproximadamente 20 moles de óxido de etileno para cada mol de sorbitol e seus anidridos. Com relação as suas características físico-químicas são líquidos oleosos, límpidos ou ligeiramente opalescentes, de cor amarela a âmbar e possuem densidade relativa de 1,1 (g/cm³ ou g/mL a 25 °C). Quanto a sua solubilidade são praticamente insolúveis em óleos fixos e parafinas líquidas, e miscíveis em etanol absoluto, acetato de etila, metanol e água. Possuem EHL de 16,7

considerados como agentes solubilizante, resultam em dispersões límpidas a vista desarmada de óleos em água (BRASIL, 2010a; MERCK, 2013; TAYLOR; ATTWOOD, 2003). Assim, devido a estas características somadas a baixa toxicidade dessa classe de tensoativos, o polissorbato 20 é um candidato ao uso para a dispersão dos óleos essenciais em meio de cultura (Final Report [...], 1984).

Legenda: epímeros no C* correspondem a dois estereoisômeros que diferem no carbono quiral (C*)

Figura 26 - Fórmula estrutural do polissorbato 20. Fonte: BRASIL, 2010a adaptado pela autora

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação da toxicidade *in vitro*, fundamentada em testes recomendados por órgãos reguladores de métodos alternativos, e da atividade antioxidante intracelular dos óleos essenciais provenientes de plantas da flora Latino-americana *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum e *Drimys brasiliensis* Miers, candidatos a componentes em formulações cosméticas.

3.2 Objetivos específicos

- Seleção do agente ideal para dispersar os óleos essenciais em meio de cultura;
- Comparação das técnicas de detecção da viabilidade celular por corantes *Neutral Red* e MTS/PMS;
- Determinação do potencial citotóxico, fototóxico, genotóxico e antioxidante intracelular dos óleos essenciais.

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Material

O material objeto de estudo foram os óleos essenciais das folhas das plantas *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum e *Drimys brasiliensis* Miers. O óleo essencial da *Minthostachys setosa* foi fornecido pela Ms. Délia Manuela Luna Pinto que, por sua vez, o obteve pelo *Instituto de Ecologia y Plantas Medicinales* (IEPLAM) que coletou a planta antes da época do florescimento e nas primeiras horas do dia, na localidade de Taray no Peru. A planta foi identificada pelo biólogo Justo Mantilla do IEPLAM na cidade de Cusco no Peru, e depositada no Herbário do Instituto de Botânica do Jardim Botânico do Estado de São Paulo, sob o número Pinto 001.

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* foram obtidos de plantas provenientes de três populações, sendo duas da região de Mata Atlântica no sul do Estado de São Paulo - quimiotipo Cananéia, da Ilha de Cananéia, e quimiotipo Cataia, da cidade de Cajati - e uma da região de campos montanos no Estado de Minas Gerais - quimiotipo Morro Grande, da cidade de Caldas. As exsiccatas estão depositadas no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo sob os números: Moreno 34 (Ilha de Cananéia), Moreno 253 (Morro da Cataia) e Moreno 311 (Reserva Morro Grande).

Proveniente da planta da *Drimys brasiliensis*, o óleo essencial foi obtido de folhas provenientes da cidade de Campos do Jordão no Estado de São Paulo. A exsicata está depositada no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo sob o número Nascimento 78.

As linhagens celulares utilizadas para os ensaios de citotoxicidade foram: BALB/3T3 clone A31 (ATCC[®], CCL-163TM); CHO-K1 (ATCC[®], CCL-61TM); e WS1 (ATCC[®], CRL-1502TM). Para fototoxicidade foi a BALB/3T3 clone A31, para a genotoxicidade a CHO-K1 e para atividade antioxidante intracelular a WS1. Ressalta-se que, essas células foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC[®]), por não serem células primárias, a submissão ao Comitê de Ética para Experimentação Animal não foi necessária.

A composição do meio de cultura para o cultivo da linhagem a BALB/3T3 clone A31 foi denominada D10 que corresponde ao DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*, Gibco[®], número de catálogo 12800017) suplementado com 10 % (v/v) de DBS (*Donnor Bovine Serum*, Gibco[®], 16030074), 1 % (v/v) da solução de antibiótico e antimicótico (Gibco[®], número de catálogo 15240062) contendo 0,1 g/L de anfotericina, de 0,5 a 1,5 g/L de sulfato de estreptomicina e penicilina G; e de 2 mM de L-glutamina (Gibco[®], número de catálogo 25030149) (ATCC, 2013a). Para o cultivo das linhagens CHO-K1 e WS1 foram utilizados os meios de cultura denominados RPMI10 e RPMI5 que correspondem a RPMI-1640 (Gibco[®], número de catálogo 23400021)

suplementado, respectivamente com 5 e 10 % (v/v) de SFB (Soro Fetal Bovino, Gibco[®], número de catálogo 12657) e 1 % (v/v) da solução de antibiótico e antimicótico (Gibco[®], número de catálogo 15240062) (RODAS *et al.*, 2008; FRADE *et al.*, 2010).

4.2 Métodos

Os ensaios que envolveram cultura de células foram realizados em condições assépticas segundo as recomendações do *OECD Principles on Good Laboratory Practice* (OECD, 1998). A incubação celular ocorreu a 37 °C em atmosfera úmida e 5 % de CO₂, até que as células atingirem a subconfluência de aproximadamente de 80 % no frasco de cultura celular (75 e 150 cm², Corning[®] e TPP[®]). O processo de descolamento celular ocorreu pela ação da solução de tripsina (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 9002-07-7) 0,05 % (p/v) / EDTA (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 60-00-40) 0,02 % (p/v) em *Phosphate buffered saline* (PBS) pH 7.4 (ICCVAM, 2006).

Os experimentos foram conduzidos conforme o fluxograma de atividades a seguir:

Extração dos óleos essenciais	• Hidrodestilação das partes aéreas das plantas <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> e <i>Drimys brasiliensis</i>
Determinação da densidade relativa	• Determinação da densidade relativa dos óleos essenciais
Dispersão dos óleos essenciais em meio de cultura	• Dispersão dos óleos essenciais nos meios de cultura D10 e RPMI10
Comparação das técnicas de detecção da viabilidade celular	• Citotoxicidade por MTS/PMS e NR na linhagem celular BALB/3T3 clone A31
Teste de citotoxicidade	• Citotoxicidade dos óleos essenciais nas linhagens celulares BALB/3T3 clone A31, CHO-K1 e WS1
Teste de fototoxicidade	• Fotototoxicidade dos óleos essenciais na linhagem celular BALB/3T3 clone A31
Teste de genotoxicidade	• MNvit, pelo método clássico e por citometria de fluxo, dos óleos essenciais na linhagem celular CHO-K1
Atividade antioxidante intracelular	• Potencial antioxidante intracelular dos óleos essenciais da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> e <i>Minthostachys setosa</i> na linhagem celular WS1
Análise estatística dos resultados	• Teste de equivalência TOST; teste t; análise de variância ANOVA One-way; teste Bonferroni; e teste Dunett's

4.2.1 Extração dos óleos essenciais

A obtenção dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Drimys brasiliensis* foi pelo processo de extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (Figura 27), conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b). As etapas iniciais realizadas no processo de extração foram: pesar em balança semianalítica cerca de 250g de folhas secas previamente picadas; colocar o material vegetal em balão de fundo redondo com capacidade de 6 L; adicionar cerca de 3 L de água destilada; acoplar o balão à manta aquecedora e ao aparelho de Clevenger, previamente conectado ao banho termostático de refrigeração; e ligar o termostato da manta em temperatura máxima até iniciar a destilação. Após o início da destilação, reduzir a temperatura de forma a manter o sistema nessas condições por 4 horas.

Figura 27 - (A) Aparelho de Clevenger modificado acoplado ao balão de fundo redondo, contendo o material vegetal, e posicionado em manta térmica. (B) Frasco coletor do óleo essencial. Fonte: BRASIL, 2010b adaptado pela autora

Após a obtenção do óleo essencial, o sistema que foi lavado com éter dietílico (MERCK®, número CAS 60-29-7). Em seguida, no material extraído foi adicionado sulfato de sódio anidro (Synth®, número CAS 7757-82-6) para a adsorção da água eventualmente presente. O óleo foi transferido cuidadosamente para um frasco específico, previamente tarado em balança analítica, que foi acoplado a um evaporador rotativo (Büchi-R124) para a extração do solvente, durante cerca de

20 minutos em banho de água a temperatura de 25 °C (Büchi-B481). Após este processo, o frasco contendo o óleo essencial foi pesado em balança analítica, a diferença entre a massa do frasco contendo o óleo (g) e do frasco vazio (g) resultou no valor referente à massa do óleo (g), que quando aplicado na Equação 2 (BRASIL, 2010a), calculou-se a % de rendimento.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do óleo (g)}}{\text{Massa de folhas (g)}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

O óleo essencial obtido foi armazenado em frasco âmbar, com tampa esmerilhada e mantido em freezer -25 °C até a utilização.

Para o óleo essencial da *Minthostachys setosa* não foi realizado o cálculo do rendimento, pois essa amostra foi fornecida pela Ms. Délia Manuela Pinto (PINTO, 2010).

A análise da composição química de todos os óleos essenciais está descrita no ANEXO A e foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno no Instituto de Botânica. Salienta-se que, a composição química do óleo essencial da *Minthostachys setosa* (ANEXO B) foi apresentada na dissertação de Mestrado de Pinto (2010). Assim como, para a *Pimenta pseudocaryophyllus* e seus quimiotipos (ANEXOS C, D e E), a análise de suas composições químicas corresponde a uma das etapas do trabalho de doutorado em andamento da Ms. Aurea Cristina Lemos Lacerda.

4.2.2 Determinação da densidade relativa

Na temperatura de 25 °C, em microtubo, previamente tarado, foi adicionado o volume (V) de 0,5 mL do óleo essencial com o auxílio de uma micropipeta; em seguida foi pesado e o valor da massa foi anotado; o mesmo procedimento foi realizado cinco vezes a fim de se obter a média das massas. A densidade (d) relativa dos óleos essenciais foi calculada segundo a Equação 3 (BRASIL, 2010b).

$$d = \frac{m \text{ (g)}}{V \text{ (mL)}} \quad \text{Equação (3)}$$

4.2.3 Dispersão do óleo essencial dos óleos essenciais em meio de cultura

Em ensaios prévios, experimentou-se dispersar os óleos essenciais da *Minthostachys setosa* em meio de cultura nas seguintes misturas: 1 mL de etanol (MERCK®, número CAS 64-17-5) + 1 g de óleo essencial (A) e 0,5 mL de DMSO (MERCK®, número CAS 67-68-5) + 0,5 mL metanol (Synth®, número CAS 67-56-1) + 1 g óleo essencial (B). Baseado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010b), as expressões *solvente* referiu-se ao meio de cultura (DMEM) devido as suas características hidrofílica semelhantes à água, e *parte (s)* referiu-se as diluições seriadas 1:10, 1:50 e 1:1000 de 1 mL das misturas individualizadas (A e B) em meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados. Fonte: BRASIL, 2010b

<i>Solvente</i>	<i>Termo descritivo</i>
Muito solúvel	menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10 000 partes

Ressalta-se que as dispersões foram preparadas em condições assépticas na temperatura de 25 °C. Em seguida, para mimetizar as condições de incubação celular, foram mantidas por 24 e 48 horas na temperatura de 37 °C. Nessas mesmas condições e baseada na teoria do EHL de Griffin (1949) aplicado às emulsões farmacêuticas, foram realizadas outras dispersões (Tabela 2): óleos essenciais (*Minthostachys setosa*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, *Drimys brasiliensis* e bergamota) + polisorbato 20 (Synth®, número CAS 9005-64-5) + meio de cultura (D10 e RPMI10).

Tabela 2 - Concentração dos óleos essenciais e do tensoativo polissorbato 20 nas dispersões dos meios de cultura D10 e RPMI10

Óleo essencial	Dispersão	Concentração (mg/mL) do óleo essencial	Concentração (µg/mL) do polissorbato 20
<i>Minthostachys setosa</i>	A1	82,90	45,00
	B1	8,30	4,50
	C1	0,83	0,45
<i>Pimenta</i>	A2	82,80	45,00
<i>pseudocaryophyllus</i>	B2	8,30	4,50
*Cananéia	C2	0,83	0,45
<i>Pimenta</i>	A3	77,10	45,00
<i>pseudocaryophyllus</i>	B3	7,70	4,50
*Cataia	C3	0,77	0,45
<i>Pimenta</i>	A4	81,20	45,00
<i>pseudocaryophyllus</i>	B4	8,10	4,50
*Morro Grande	C4	0,810	0,45
<i>Drimys brasiliensis</i>	A5	102,70	45,00
	B5	10,30	4,50
	C5	1,030	0,45
bergamota	A6*	81,06	45,00
	B6***	8,11	4,50
	C6***	0,81	0,45

*quimiotipos

**substância referência utilizada como controle positivo para fototoxicidade

***dispersão preparada somente em meio de cultura D10

Considerou-se dispersão adequada quando, o procedimento produziu uma dispersão clara sem nebulosidade e precipitado na observação visual do analista. A condução do ensaio foi baseada na recomendação do ICCVAM (2006) para o teste de “solubilidade” da amostra em determinado solvente ou meio de cultura, que deve começar com concentração da amostra relativamente elevada e prosseguir para concentrações sucessivamente inferiores pela adição de meio de cultura, é importante destacar que as dispersões foram obtidas por meio de diluições seriadas de 1:10 (Tabela 2).

4.2.4 Comparação das técnicas de detecção de viabilidade celular

Os guias OECD/GD 129 de Citotoxicidade e OECD 432 de Fototoxicidade preconizam a utilização do corante vermelho neutro, *Neutral Red* (NR) (INVITROGEN[®], número CAS 553-24-2), para a leitura da absorbância em 540 nm. No entanto, substituiu-se a solução de NR pela de MTS

(PROMEGA[®], número CAS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, inner salt) / PMS Phenazine methosulfate (SIGMA[®], número CAS 299-11-6), com leitura da absorbância a 490 nm, por apresentar fácil manipulação. Para verificar a equivalência dos agentes colorimétricos, realizou-se um ensaio de citotoxicidade com uma substância referência, o óleo essencial da bergamota (GIVAUDAN, *Italy Orpue*, 001533, lote SX00026399). Ressalta-se que esse óleo foi também usado como controle positivo para os testes de fototoxicidade. As concentrações testadas foram preparadas a partir de diluições seriadas, resultando em valores de 0,04 a 0,53 mg/mL do óleo disperso no meio de cultura D10 (item 4.1) pelo polissorbato 20.

O ensaio de citotoxicidade do óleo de bergamota em BALB/3T3 clone A31 foi realizado no mínimo em cinco experimentos independentes e as passagens celulares utilizadas compreenderam entre P4 e P16. Foram semeadas 15.000 células por poço em placas de 96 poços (0,28 cm² de área / poço, Corning[®]) e incubadas (item 4.2) por 24 horas, totalizando quatro placas referentes à: amostra com MTS/PMS, controle do polissorbato 20 com MTS/PMS, amostra com NR, controle do polissorbato 20 NR. Em seguida o meio de cultura foi retirado, as amostras (Figura 28) e o controle do polissorbato 20 foram adicionados e novamente, as placas foram incubadas por 24 horas. Para a coloração com MTS/PMS as etapas realizadas foram: retirada das amostras; lavagem dos poços com *Phosphate buffered saline* (PBS) pH 7.4; e adição de 100 µL por poço da solução contendo 333 µg/mL de MTS e 25 µM de PMS solubilizados em quantidade suficiente para (q.s.p) meio de cultura D10 (PROMEGA[®], 2012).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
C	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
D	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
E	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
F	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
G	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

B = controle da solução MTS/PMS; VC = controle da viabilidade celular;
C1-C8 = diluições da amostra em ordem crescente de concentração (mg/mL)

Figura 28 - Esquema da disposição das células na placa de 96 poços. Fonte: NIH, 2001

Na coloração por NR foi adicionado 100 µL da solução de NR (50 µg/mL) em DMEM e incubadas por 3 horas. Após esse período, a solução de NR foi retirada, os poços lavados com PBS, para então adicionar 150 µL da solução *NR desorb solution* - 49 % (v/v) de água bidestilada, 50 % (v/v) de etanol (MERCK[®], número CAS 64-17-5) e 1 % (v/v) de ácido acético glacial (Synth[®], *Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos*

número CAS 64-19-7). Em seguida, as placas foram agitadas por 10 minutos ou até extrair todo NR das células formando uma solução homogênea.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placas (Multiskan EX 355, Thermo Electron Corporation) no comprimento de onda de 540 nm para as placas coradas com a solução de NR, e 490 nm para as placas coradas com a solução de MTS/PMS. Os valores de IC₅₀ foram calculados pelo programa PHOTOTOX[®] (2013). Em seguida, foi verificada a equivalência entre os métodos por meio da análise dos resultados pelo teste de equivalência TOST descrito no item 4.2.9.

4.2.5 Teste de citotoxicidade

Foram utilizadas séries geométricas decimais permitindo que experimentos independentes possam ser comparados mesmo quando utilizadas concentrações diferentes. Para tanto, segundo o *APPENDIX F - Decimal Geometric Concentration Series* do *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*, os fatores de diluição (F) utilizados devem ser: 3,16; 2,15; 1,47; e 1,21. Desta forma, quando há concentração de efeito biológico (mg/mL) da amostra, é possível utilizar as Equações 4 e 5 que resulta respectivamente, em valores de concentração acima (VA) e abaixo (VB) dessa concentração (NIH, 2001).

$$VA = \text{Concentração de efeito biológico (mg/mL)} \times F \quad \text{Equação (4)}$$

$$VB = \frac{\text{Concentração de efeito biológico (mg/mL)}}{F} \quad \text{Equação (5)}$$

As concentrações de efeito biológico dos óleos essenciais da *Minthostachys setosa* e *Pimenta pseudocaryophyllus* corresponderam aos seus valores de concentração mínima inibitória CMI (PINTO, 2010; LIMA *et. al.*, 2006). Os fatores de diluição utilizados para a obtenção das concentrações testadas foram 2,15; 1,47; e 1,21 (Tabela 3).

Tabela 3 – Intervalo das concentrações dos óleos essenciais provenientes do cálculo do CMI pelos fatores de diluição 2,15; 1,47 e 1,21

Óleo essencial	*CMI (mg/mL)	Concentrações (mg/mL) fator 2,15	Concentrações (mg/mL) fator 1,47	Concentrações (mg/mL) fator 1,21
<i>Minthostachys setosa</i>	0,028	0,003 a 0,598	0,013 a 0,611	0,028 a 0,866
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	0,044	0,004 a 0,932	0,02 a 0,951	0,044 a 0,921
Cananéia				
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	0,041	0,004 a 0,870	0,019 a 0,888	0,004 a 0,870
Cataia				
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	0,043	0,004 a 0,913	0,02 a 0,935	0,043 a 0,903
Morro Grande				

*CMI = concentração estimada de efeito biológico que correspondeu à concentração mínima inibitória

Diferentemente, o óleo essencial da *Drimys brasiliensis* não possui estudo referente ao valor CMI desta forma, as concentrações do teste de citotoxicidade em BALB/3T3 clone A31 foram obtidas a partir de diluições seriadas resultando em valores entre 0,04 e 0,33.

O ensaio de citotoxicidade em BALB/3T3 clone A31 foi realizado em cinco experimentos independentes e as passagens celulares utilizadas compreenderam entre P12 e P16. Foram semeadas 15.000 células, em meio de cultura D10 (item 4.1), por poço em placas de 96 poços (0,28 cm² de área / poço, Corning®) e incubadas (item 4.2) por 24 horas. Em seguida foram adicionadas as amostras e o controle do polissorbato 20 (Figura 28) e após 24 e 48 horas, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com a solução de PBS, adicionou-se 100 µL da solução contendo 333 µg/mL de MTS e 25µM de PMS solubilizados em q.s.p. do meio de cultura D10. Após 3 horas de incubação, foi realizada a medida de absorbância, com o λ de 490 nm no espectrofotômetro de placas (Spectra Max 190, Molecular Devices Brasil) (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

Aos resultados da leitura de absorbância de cada amostra, foi subtraída pela média do valor obtido para o branco. Para a viabilidade celular de cada concentração da amostra foi considerada a viabilidade relativa, calculada pelo valor da absorbância da amostra dividida pelo seu correspondente em concentração do controle do polissorbato 20 e multiplicado por 100. Em seguida, esses valores de viabilidade foram submetidos ao programa estatístico GraphPad Prism®, que gerou as curvas dose-resposta com a barra de erro padrão da média e seus respectivos valores

de R^2 e IC_{50} . Os valores de IC_{50} para 24 e 48 horas das amostras foram submetidos à análise estatística, conforme item 4.2.9. Esses resultados foram utilizados para determinar a toxicidade oral aguda por meio da DL_{50} , segundo a Equação 6 (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

$$\log DL_{50}(\text{mg/kg}) = 0,372 \times \log IC_{50}(\mu\text{g/mL}) + 2,024 \quad \text{Equação (6)}$$

Baseado no teste de citotoxicidade e com o intuito de gerar uma curva dose-resposta dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, da *Minthostachys setosa* e da *Drimys brasiliensis* em células CHO-K1 para serem utilizadas no teste do micronúcleo *in vitro* (MNvit). Foram realizados no mínimo três ensaios independentes, as concentrações utilizadas foram obtidas a partir de diluições seriadas resultando em valores entre 0,02 e 0,8 mg/mL. As passagens celulares utilizadas compreenderam entre P8 e P11. Foram semeadas 5000 células por poço em placas de 96 poços em meio RPMI10 (item 4.1) e incubadas (item 4.2) por 24 horas. Em seguida foram adicionadas as amostras e após 24 horas de incubação, foi realizada a coloração pela solução de MTS/PMS.

Visando determinar as concentrações ideais para o ensaio da atividade antioxidante intracelular, foi verificada a viabilidade celular da linhagem WS1 por meio do corante MTT (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 57360-69-7). Por poço da placa de 96 (0,28 cm² de área / poço, TPP[®]) foram semeadas cerca de 5000 células (P15) em meio RPMI10 (item 4.1). Em seguida foi realizada a incubação (item 4.2) das células e, após a confluência celular foram adicionadas as amostras dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, da *Minthostachys setosa* e o controle do polissorbato 20, nas concentrações entre 0,086 e 0,37 mg/mL em meio RPMI5. Transcorrido 24 horas de incubação das células, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com PBS e adicionada a solução de MTT a 0,5 mg/mL em RPMI5 (item 4.1). Após 3 horas de incubação foram adicionados 100 µL de DMSO por poço (CARRERA *et al.*, 2010). Em seguida as placas foram agitadas por aproximadamente um minuto e a leitura da absorbância foi realizada no λ a 595 nm do espectrofotômetro de placas (Anthos Zenyth 3100).

4.2.6 Teste de fototoxicidade

O ensaio de fototoxicidade foi conduzido com a Ms. Bianca da Silva Sufi em Tecnologia das Radiações, cujo tema da dissertação de Mestrado foi “*Utilização de co-cultura de melanócitos e queratinócitos para avaliação do potencial do Líquido da Castanha*

de Caju (LCC) como agente despigmentante”, sob orientação da Dra. Monica Beatriz Mathor do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, autarquia estadual associada à Universidade de São Paulo e gerenciada pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN).

O ensaio foi realizado em no mínimo três experimentos independentes para as amostras: os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, da *Minthostachys setosa* e da *Drimys brasiliensis*; lauril sulfato de sódio (LSS), como controle negativo ou não fototóxico; e o óleo essencial de bergamota como controle positivo, descrito como potencialmente fototóxico (OECD 432, 2004; KEJLOVÁ, *et al.*, 2007).

Aos óleos essenciais foi adicionado o volume referente a 10 % (v/v) de polissorbato 20, em seguida, para todas as preparações foram realizadas diluições seriadas em PBS+, composto por *Phosphate buffered saline* com 0,1 % (p/v) de cálcio e 0,13 % (p/v) de magnésio. Foram necessárias quatro diluições seriadas até atingirem aspecto translúcido à vista desarmada, correspondendo a concentração de 0,1 mg/mL. A partir da qual foram preparadas as concentrações entre 0,005 e 0,1 mg/mL, sendo essas calculadas pelo fator de diluição 1,47. De acordo com o *INVITTOX protocol* (ECVAM DB-ALM: *INVITTOX protocol* (ECVAM), 2008), as diluições das amostras foram preparadas imediatamente antes da sua utilização e ao abrigo da luz, para evitar sua foto-ativação ou degradação antes da irradiação.

Para a cultura celular foram semeadas 15.000 células BALB/3T3 clone A 31, em meio de cultura D10 (item 4.1), por poço em placas de 96 poços (0,28 cm² de área de cada poço, Corning®). As passagens celulares em cada experimento corresponderam a P10, P16 e P18. Para cada amostra foram preparadas duas placas, uma exposta a luz UVA e outra mantida ao abrigo. Após 24 horas de incubação (item 4.2), o meio de cultura foi retirado e as amostras foram adicionadas em ordem crescente de concentração, como demonstrado na Figura 28. Em seguida as duas placas foram incubadas estufa de CO₂ nas condições já mencionadas (item 4.2). Decorrido uma hora as placas foram posicionadas na câmara de fototoxicidade (Figura 29) em temperatura ambiente por 75 minutos, período correspondente a dose de 5 J/cm². Ressalta-se que a intensidade da luz UVA da câmara foi qualificada com Radiômetro (UV-Meter, Hönle UV Technology) equipado com sensor de UVA, cujo espectro é de 320 a 400 nm.

Figura 29 - (A) Esboço de câmara de fototoxicidade com área total de aproximadamente 0,153 m³ e área de trabalho de 153.000 cm². (B) Fotografia da câmara de fototoxicidade finalizada. Figuras concedidas pela Ms. Bianca da Silva Sufi

Após o período de exposição, as amostras em teste foram retiradas e as placas lavadas com PBS+. Em seguida o tampão foi substituído por meio de cultura e as placas foram novamente incubadas em estufa por 22 a 24 horas. Após esse período, foi realizada a coloração pela solução de MTS/PMS e a leitura da absorbância foi realizada a 490 nm (OECD 432, 2004; ECVAM, 2008).

Os resultados obtidos determinou o *Photo Irradiation Fator* (PIF) calculado segundo a Equação 7 citada no guia da OECD 432 (2004), que sugere o uso desse fator para a análise da fototoxicidade. De acordo com o fator: se uma substância tem $PIF < 2$ prevê-se ausência de fototoxicidade; $PIF > 2$ prevê-se provável fototoxicidade; e $PIF > 5$ prevê-se fototoxicidade (SPIELMANN *et al.*, 1998).

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+IRR)} \quad \text{Equação (7)}$$

Onde os valores de $IC_{50}(-Irr)$ é a dose correspondente a 50 % de morte celular do controle não irradiado e $IC_{50}(+Irr)$ é a dose correspondente a 50 % de morte celular do

controle irradiado. Na realização do cálculo do PIF foi utilizado o Programa PHOTOTOX[®] (2013) e a análise estatística desses resultados foi verificada, conforme item 4.2.9.

4.2.7 Teste de genotoxicidade

Teste MNvit pelo método clássico – leitura de lâminas

As concentrações testadas de cada amostra dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos: Cananéia, Cataia e Morro Grande), da *Minthostachys setosa* e da *Drimys brasiliensis*, compreenderam valores com mais de 90 % de viabilidade celular, determinado pelo teste de citotoxicidade (item 4.2.5). Todo o procedimento foi baseado no guia da OECD 487 (2010). Para cada poço de 9,6 cm² (Corning[®]) da placa de 6, foram semeadas 20.000 células de CHO-K1 (P10) em meio RPMI10 (item 4.1) e incubadas por 48 horas (item 4.2). Em seguida, foram adicionadas as amostras concentração dos óleos (0,167 mg/mL para *Minthostachys setosa*; 0,125 mg/mL para Cananéia; 0,103 mg/mL para Cataia; 0,127 mg/mL para Morro Grande; e 0,014 mg/mL para *Drimys brasiliensis*) os controles positivos e negativos com e sem ativação da solução Mix S9, conforme Figura 30. Ressalta-se que nesse ensaio, para cada amostra foram realizadas duas repetições.

A solução Mix S9 foi preparada conforme Esteves-Pedro e colaboradores (2011), composta por: 33,05 % (v/v) de água destilada e autoclavada; 57,85 % de tampão fosfato a 0,2 M com pH 7.4; 33,31 % (v/v) de NADP (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 698999-85-8) a 0,1 M; 0,83 % (v/v) de D-glicose-6-fosfato monossódico (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 54010-71-8) a 1 M; 1,65 % (v/v) da solução de sais KCl (CAAL[®], número CAS 7447-40-7) a 1,56 M e MgCl₂ (CRQ[®], número CAS 7786-30-3) a 0,4 M; 3,31 % (v/v) de S9 (SIGMA-ALDRICH[®], número de catálogo S2067).

CC controle de células; NaCl cloreto de sódio (Synth[®], número CAS 7647-14-5); Tw20 polissorbato 20; BZP benzo[α]pireno (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 50-32-8); Colch colchicina (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 64-86-8); MTMC mitomicina C (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 50-07-7); citoB citocalasina B (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 14930-96-2)

Figura 30 - Esquema representativo do teste do micronúcleo *in vitro* após 48 horas de incubação das células CHO-K1 (OECD 487, 2010)

Após as 20 horas de incubação as células de cada um dos poços foram descoladas com Tripsina 0,05 % (p/v) / EDTA 0,02 % (p/v) e cada amostra foi transferida para tubos cônicos de 15 mL (Corning[®]) previamente identificados e codificados por números, permitindo aleatoriedade a partir desta etapa. Em seguida esses tubos cônicos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 5 mL da solução de NaCl 0,9 % (p/v). Novamente as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e adicionada a solução hipotônica 3:1 de metanol (Synth[®], número CAS 67-56-1) e ácido acético glacial (Synth[®], número CAS 64-19-7), procedimento este repetido por quatro vezes após centrifugação a 1500 rpm por cinco minutos (ESTEVES-PEDRO *et al.*, 2011; RODAS; LOPES; HIGA, 2009).

Em seguida, o sobrenadante foi descartado deixando apenas 1 mL para ser ressuspendido e gotejado em três lâminas, dispostas sobre banho termostatzado (Figura 31) a temperatura de 65 °C, por três minutos. As lâminas foram secas, a temperatura ambiente e em local livre de poeira e posteriormente coradas com Giemsa Stain (Gibco[®], número CAS 51811-82-6) a 5 % (v/v) em tampão Sorensen, por 15 minutos (ESTEVES-PEDRO *et al.*, 2011; RODAS; LOPES; HIGA, 2009).

Figura 31 - Procedimento de gotejar a solução de fixador em lâminas posicionadas sobre o banho termostatzado a 65 °C

A contagem foi realizada no microscópio óptico (na objetiva de 20 e 40 x) para cada amostra e considerou-se como finalizada quando foram contabilizadas 1000 células binucleadas. Para os resultados obtidos na contagem do número células totais (CT), células mononucleadas (CM), células binucleadas (CB) e células multinucleadas (CMu) foram determinados os índices *Cytokinesis-Block Proliferation Index* (CBPI) e *Replication Index* (RI), descritos no OECD 487 (2010) e a porcentagem da frequência de micronúcleos (% FMN), apresentados nas Equações 8, 9 e 10.

$$CBPI = \frac{((n^{\circ}CM) + (2 \times n^{\circ}CB) + (3 \times n^{\circ}CMu))}{(n^{\circ} \text{ total de células})} \quad \text{Equação (8)}$$

O CBPI foi calculado a partir dos valores obtidos nas leituras das lâminas de CM, CB e CMu, e o erro entre a leitura das lâminas, obtidas das duas repetições por amostra, foram analisadas pelo modelo estatístico *Poisson* (MARGOLIN *et al.*, 1986). Esse índice corresponde ao número médio de ciclos que cada célula sofre durante período de exposição à citocalasina B e pode ser utilizado para calcular a proliferação celular.

$$RI = \frac{((n^{\circ}CB) \times (2 \times CMu)) \div (n^{\circ}CT)}{((n^{\circ}CB) + (2 \times CMu)) \div (n^{\circ}CC)} \times 100 \quad \text{Equação (9)}$$

O RI foi calculado também a partir dos valores obtidos nas leituras das lâminas de CM, CB, CMu, células tratadas (CT) e controle de células (CC). Esse índice é uma forma de comparação do número de células binucleadas ou multinucleadas que se encontra em processo de divisão, quanto maior o seu valor, menor será a quantidade de células citostáticas, conseqüentemente, menor será a citotoxicidade da amostra (OECD 487, 2010). Aos valores da média do RI das amostras foi calculado o desvio padrão.

A % FMN foi calculada por meio dos valores contabilizados de CB e CT, demonstrados na Equação 10 (ESTEVEZ-PEDRO *et. al*, 2010). Aos valores da média da % FMN foi calculado o erro padrão da média (MUTH, 2006).

$$\% FMN = \frac{CB}{CT} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

A análise estatística dos resultados obtidos nos índices de CBPI, de RI e da % FMN foi verificada conforme descrito no item 4.2.9.

Teste do MNvit por citometria de fluxo

Foram semeadas 20.000 células CHO-K1 (P8 a P13) por poço (9,6 cm²) da placa de 6 poços e incubadas (item 4.2) por 48 horas. Em seguida, foram adicionadas as amostras, os controles positivos e negativos com e sem ativação da solução Mix S9 (Figura 30). O teste foi realizado em no mínimo três ensaios independentes.

Após 20 horas de incubação as células foram descoladas com Tripsina 0,05 % (p/v) / EDTA 0,02 % (p/v) e transferidas para tubos cônicos de 15 mL, os quais foram centrifugados a 1500 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5 mL de PBS com 2 % de SFB (Gibco[®], número de catálogo 12657). Novamente os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e adicionados por tubo 300 µL da **EMA solution** que continha 8,5 µg/mL de EMA (*ethidium monoazide bromide*, Invitrogen[®], número de catálogo E1374) em PBS com 2 % de SFB. Em seguida, os tubos foram colocadas em banho com camada de gelo de aproximadamente 2 cm e expostos há 10 cm de uma lâmpada fluorescente, Figura 32 (BRYCE *et al.*, 2007).

Figura 32 - Exposição à lâmpada fluorescente das amostras no teste do MNvit por citometria de fluxo

Após 30 minutos foram adicionados 3 mL da solução de PBS com 2 % de SFB a temperatura de aproximada de 4 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm e apenas 50 µL do sobrenadante foram mantidos no tubo. Para minimizar a foto-ativação, os tubos foram imediatamente envolvidos por papel alumínio. Após 30 minutos, foram adicionados 550 µL por tubo da solução **Lysis Solution 1** composta por: 0,584 mg/mL de NaCl (Synth[®], número CAS 7647-14-5); 1 mg/mL de citrato de sódio dihidratado (Synth[®], número CAS 6132-04-3); 0,3 µL/mL de Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 9002-93-1); 0,5 mg/mL de RNase A (SIGMA-ALDRICH[®], número CAS 9001-99-4); 0,4 µM de SYTOX[®] Green (Molecular Probes[®], número de catálogo S7020) em água deionizada (BRYCE *et al.*, 2007). Ressalta-se que, o reagente Triton X-100 foi utilizado em substituição ao Igepal por se tratarem de estruturas químicas semelhantes, sendo o Triton X-100 ligeiramente mais hidrofílico (SIGMA-ALDRICH[®], 2013b).

Após 3 minutos de repouso, as soluções foram homogeneizadas por 5 segundos em agitador de tubos tipo vórtex e mantidos por uma hora em condição de repouso a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 550 µL por tubo da solução **Lysis Solution 2** composta por: 85,6 mg/mL de sacarose (Synth[®], número CAS 57-50-1); 15 mg/mL de ácido cítrico (MERCK[®], número CAS 77-92-9); 0,4 µM de SYTOX[®] Green em água deionizada. Transcorrido 3 minutos os tubos foram agitados novamente por 5 segundos, após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente, os tubos foram mantidos a 4 °C e ao abrigo da luz (BRYCE *et al.*, 2007).

Para a análise em citômetro de fluxo, as amostras à temperatura ambiente foram ressuspensas vagarosamente. A aquisição dos eventos pelo equipamento foi realizada por um feixe de laser a 488 nm de excitação. O SYTOX[®] Green e o EMA que corresponderam ao FITC e PerCP-

Cy5-5, que emitiram fluorescências coletadas nos λ 530 e 670 nm, respectivamente. A fluorescência foi medida no equipamento FACSCanto™ II (BD Biosciences®), Figura 33, e analisada no *software* FlowJo. É importante destacar que, a incidência de micronúcleos foi determinada por meio da aquisição de pelo menos 10.000 eventos por amostra na região das células nucleadas.

Figura 33 - (A) citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences®). (B) em destaque o tubo de citômetro com a amostra

A análise estatística dos resultados obtidos da % de micronúcleos e a % das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) foram verificados conforme descrito no item 4.2.9.

4.2.8 Atividade antioxidante intracelular

O estado oxidativo das células WS1 tratadas com os óleos essenciais foi verificada por meio da sonda 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (SIGMA®, número CAS 2044-85-1). As amostras desse ensaio foram: os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos: Cananéia, Cataia e Morro Grande) e *Minthostachys setosa* nas concentrações (item 4.2.5) de 0,028 e 0,04 mg/mL; o controle do polissorbato 20 na proporção de 10% (v/v) em relação a quantidade do óleo essencial; o controle de células com sonda; e o controle de células sem sonda. Foram realizados três ensaios independentes e para cada um deles foram realizadas três repetições por amostra.

Cerca de 5000 células WS1 foram semeadas, por poço em placas de 96 poços (0,28 cm² de área / poço, Corning®), em meio RPMI10 (item 4.1) e incubadas (item 4.2) até atingirem a confluência. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com a solução de PBS pH 7.4 e adicionados por poço 20 μ M da sonda diluída em DMSO (MERCK®, número CAS 67-68-5). Para

o controle de células sem sonda, adicionou-se por poço cerca de 20 μL de HBSS *Hank's Buffered Salt Solution* (Gibco[®], número de catálogo 14025076) (SAUER *et al.*, 2003).

Após 20 minutos de incubação, foram adicionadas as amostras, preparadas em HBSS, nos poços. Transcorrido 1 hora de incubação, as células foram lavadas com solução de PBS e foram adicionados 30 μL da solução de tripsina 0,05 % (p/v) / EDTA 0,02 % (p/v). As células foram incubadas, por aproximadamente 5 minutos, ou até o descolamento celular, procedimento esse visto ao microscópio invertido (SAUER *et al.*, 2003). Em seguida foram adicionados 100 μL de HBSS e a fluorescência foi determinada no citômetro de fluxo para placas (Gava Easy Cyte HT, Millipore[®]), Figura 34. A aquisição dos eventos pelo equipamento foi realizada por um feixe de laser a 488 nm de excitação e a análise dos 5000 eventos adquiridos foi realizada pelo *software* InCyte v.2.2.2. A análise estatística dos resultados obtidos de ERO intracelular foi verificada conforme descrito no item 4.2.9.

Figura 34 - Citômetro de fluxo de placas (Gava Easy Cyte HT, Millipore[®])

4.2.9 Análise estatística

Para o ensaio de comparação dos corantes MTS/PMS e NR utilizados nas técnicas de detecção de viabilidade celular (item 4.2.4), foi realizada a análise estatística dos resultados pelo teste de equivalência TOST (LOURENÇO; PINTO, 2012). Foi considerado um intervalo de confiança de 90 % e diferença cientificamente significativa Δ de 20 %, calculado a partir da média de todos os valores de IC_{50} , tanto MTS/PMS quanto NR.

A análise realizada entre os valores de IC₅₀ 24 e 48 horas para cada amostra de óleo essencial foi por meio do teste t pareado que, compara as médias de dois grupos correspondentes, assumindo que a distribuição das diferenças antes e depois segue uma distribuição de Gauss (MUTH, 2006). O intervalo de confiança utilizado foi de 95 %.

No ensaio de fototoxicidade, os valores obtidos de PIF para todas as amostras foram submetidos à análise de variância ANOVA One-way, que é normalmente utilizada para testar a hipótese geral que não existem diferenças entre as médias dos tratamentos, sendo esses valores considerados significativos, $p < 0,05$, no trabalho (FESTING, 2001). A diferença estatística entre os grupos foi verificada no teste Bonferroni com intervalo de confiança de 95 %.

No ensaio MNvit clássico de leitura das lâminas e por citometria de fluxo, os resultados obtidos nas amostras sem e com S9 foram analisadas separadamente. Os valores de CBPI foram submetidos à análise de variância ANOVA One-way e teste Dunett's, que verifica a diferença de cada média das amostras com o controle, no intervalo de confiança de 95 %. Os valores de RI, frequência e micronúcleo, % de micronúcleo e % das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) foram também submetidos à análise ANOVA One-way, porém, a diferença estatística entre os grupos foi verificada no teste Bonferroni com intervalo de confiança de 95 %.

Para os valores de ERO, obtidos no ensaio da atividade antioxidante intracelular, foi realizada à análise de variância ANOVA One-way e teste Dunett's, no intervalo de confiança de 95 %.

Salienta-se que com exceção do teste de equivalência TOST que foi realizado no Microsoft Excel, as demais análises foram feitas no GraphPad Prism[®] versão 5.0

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, obtidos por hidrodestilação, foram reunidos conforme a sua procedência e apresentaram rendimento médio de 2,7074 % (p/p) para Cananéia, 1,1546 % (p/p) para Cataia e 0,9058 % (p/p) para Morro Grande. Custódio e colaboradores (2010) obtiveram o rendimento de 1 % para o óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*, coletada no estado do Paraná, valor esse inferior em no mínimo 15 % aos obtidos nos quimiotipos Cananéia e Cataia. O óleo essencial da *Drimys brasiliensis* Miers, também obtido por hidrodestilação, resultou no rendimento médio 0,3042 % (p/p). Destaca-se que este valor corrobora com a pesquisa de Limberger e colaboradores (2007) que obtiveram os rendimentos de 0,4 % a 1,5 % e de 0,3 % a 0,4 % respectivamente, para os óleos essenciais das espécies *Drimys brasiliensis* Miers e *Drimys angustifolia* Miers, coletadas no estado do Rio Grande do Sul.

Ressalta-se que, podem ocorrer diferenças tanto no rendimento quanto na composição química dos óleos essenciais descritos na literatura e os obtidos neste presente estudo. Essas divergências ocorrem devido aos aspectos ambientais (ou edáficos) extrínsecos à biologia vegetal, como as diferenças entre o solo e o clima dos locais onde as plantas foram coletadas, resultando em produtos de extração e metabólitos secundários que podem variar na quantidade e composição (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009).

A análise da composição química dos óleos essenciais deste estudo foi realizada pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno, por meio da cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG/SM), apresentada nos ANEXOS B, C, D, E e F.

Os compostos majoritários identificados no óleo essencial da *Minthostachys setosa* (ANEXO B) foram os monoterpenos monocíclicos pulegona com 28,6 % e mentona com 12,6%. Na literatura, encontram-se estudos relacionados à presença desses monoterpenos como compostos majoritários, e às atividades antimicrobiana e inseticida dos óleos essenciais desse gênero. A importância etnobotânica dessa planta se deve ao uso pela população andina, como inseticida para proteger culturas de batata e como conservante para armazená-las (SENATORE, 1998; HOLGUÍN, 2005). Fournet e colaboradores (1996) atribuíram a ação inseticida do óleo essencial da espécie *Minthostachys mollis* var. *mandoniana* (Briq.) Schmidt-Leb. (SCHMIDT-LEBUHN, 2008) à presença dos compostos majoritários pulegona com 25,5 % e mentona com 24,85 %. Com relação à atividade antimicrobiana destaca-se que: na espécie *Minthostachys verticillata*, De Feo e colaboradores (1998) identificaram 37,8 % de pulegona e 29,2 % de mentona, enquanto para Primo e colaboradores (2001) os valores quantificados foram 44,56 % de pulegona e 39,51 % de mentona; e na espécie *Minthostachys mollis*, Mora e colaboradores (2009) identificaram a presença de 55,2 %

de pulegona e 31,5 % de mentona. Frente a esse cenário, pode-se atribuir a atividade antimicrobiana desse óleo essencial à presença dos monoterpenos pulegona e mentona -(PINTO, 2010).

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, procedentes de três regiões, apresentaram composições químicas distintas (ANEXOS C, D e E), sendo estes tratados como variedades químicas ou quimiotipos, devido as diferentes expressões de suas vias metabólicas (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2009). Entretanto, o eugenol classificado como fenilpropanoide alibenzene, foi o composto majoritário comum entre os quimiotipos com 31,5 % para Cananéia, 17,9 % para Cataia e 19,6 % para Reserva Morro Grande. Lima e colaboradores (2006) verificaram nos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* das localidades no estado de São Paulo, Ilha do Cardoso e Paranapiacaba respectivamente a presença de 71,9 % de eugenol e 94,6 % de 4-metil-eugenol, e a esses compostos os autores atribuíram a atividade antimicrobiana. Assim como, Custódio e colaboradores (2010) também verificaram alta atividade antimicrobiana nessa planta, que apresentou 92,59 % de eugenol. Ressalta-se que, além das atividades antimicrobianas é atribuída ao eugenol a atividade antioxidante (JAGANATHAN; SUPRIYANTO, 2012).

A identificação química do óleo essencial da *Drimys brasiliensis* apresentou 23,4 % do monoterpeno bicíclico α -pineno e 21% do sequiterpeno ciclocolorenona. Limberger e colaboradores (2007, 2008) sugeriram a ciclocolorenona da *Drimys brasiliensis* como marcador químico na identificação da espécie, pois apresentaram esse sequiterpeno como composto majoritário com 28,3 % para o óleo essencial proveniente das cascas e 16 % para aquele proveniente das folhas. Dognini (2012) verificou que dentre os ativos presentes no óleo essencial da *Drimys angustifolia* a ciclocolorenona quando isolada apresentou expressiva atividade antimicrobiana para o valor de 219 $\mu\text{g/mL}$ referente à CMI. Essa atividade antimicrobiana também foi verificada para diferentes frações do extrato vegetal da espécie *Drimys brasiliensis*, que resultou nos valores 3 e 25 $\mu\text{g/mL}$ para CMI (MALHEIROS *et al.*, 2005).

Visto que, assim como a atividade antimicrobiana é pautada nos valores de CMI representados por determinada massa (μg) a cada 1 mL da amostra, os valores de IC podem ser representados em mg/mL . Para calcular esses valores é necessária a determinação da densidade relativa das amostras avaliadas. Salienta-se que os óleos essenciais de uma mesma espécie podem apresentar diferenças nos valores de densidade relativa, pois como já discorrido, esses podem apresentar diferentes composições químicas. Para o óleo essencial da *Minthostachys setosa* o valor da densidade relativa foi de 0,91178 g/mL , segundo Pinto (2010). Para os demais óleos essenciais

os valores obtidos da densidade relativa (Tabela 4) foram: 0,9090 mg/mL para Cananéia; 0,8930 mg/mL para Cataia; 0,8482 mg/mL para Morro Grande; 0,9104 mg/mL para *Drimys brasiliensis*; e 0,8916 mg/mL para bergamota.

Tabela 4 - Média da massa (g) a cada 0,5 mL do óleo essencial, desvio padrão (**DP**) da massa e a densidade relativa (**dR**) a 25 °C para óleos essenciais *Pimenta pseudocaryophyllus*, *Drimys brasiliensis* e bergamota

Óleo essencial	Média da massa (g) a cada 0,5 mL	DP	dR (g/mL)
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> *Cananéia	0,4545	0,001	0,9090
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> *Cataia	0,4465	0,002	0,8930
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> *Morro Grande	0,4241	0,002	0,8482
<i>Drimys brasiliensis</i>	0,4552	0,004	0,9104
Bergamota	0,4458	0,002	0,8916

* quimiotipos

Desse modo, com os valores da densidade relativa dos óleos essenciais foi possível calcular as concentrações dessas amostras utilizadas nos ensaios, como por exemplo, na dispersão do óleo essencial em meio de cultura. Nesse ensaio, inicialmente foram utilizadas as misturas **A** e **B** do óleo essencial da *Minthostachys setosa* (item 4.2.3) em meio de cultura, que não apresentaram solubilidade (Tabela 1), nas diluições de 1:10, 1:50 e 1: 1000 referentes a 24 e 48 horas a 37 °C (item 4.2.3). A baixa densidade somada à insolubilidade do óleo essencial fez com que houvesse a formação de um halo sobre o meio de cultura (Figuras 35 e 36), comprovando que houve separação de fases, portanto a não homogeneidade nas diluições.

Figura 35 - Diluições seriadas da mistura A em meio de cultura. (A) após 24 horas de em estufa. (B) após 48 horas em estufa a 37 °C

Figura 36 - Diluições seriadas da mistura B em meio de cultura. (A) após 24 horas em estufa. (B) após 48 horas em estufa a 37 °C

Conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b, p. 57) “a solubilidade indicada não deve ser tomada no sentido estrito de constante física, porém, complementa e corrobora com os demais ensaios, podendo ter um valor definitivo caso a substância não apresente a solubilidade mínima exigida, principalmente, no solvente água”. Frente à instabilidade das misturas dos óleos essenciais no meio de cultura, recorreu-se aos conceitos de emulsões farmacêuticas. Assim, baseado na teoria do EHL de Griffin (1949), o uso do agente solubilizante o tensoativo polissorbato 20 (monolaurato de sorbitano) de EHL 16,7, pode gerar uma dispersão estável dos óleos essenciais no meio de cultura.

Desse modo, as dispersões dos óleos essenciais obtidas com polissorbato 20 em meio de cultura (D10 e RPMI10), permitiram que a estabilidade fosse alcançada por meio de dispersões claras, translúcidas a vista desarmada e sem a presença de precipitados (ICCVAM, 2006). Entre as dispersões avaliadas após 24 e 48 horas (item 4.2.3), as que se apresentaram melhor estabilidade foram: C1 para *Minthostachys setosa* (Figura 37); C2 para Cananéia (Figura 38); C3 para Cataia (Figura 39); C4 para Morro Grande (Figura 40); C5 para *Drimys brasiliensis* (Figura 41); e C6 para a bergamota (Figura 42).

Dispersão A1 = 82,90 mg/mL de óleo essencial, 45,00 µg de polissorbato 20/mL
Dipersão B1 = 8,30 mg/mL de óleo essencial, 4,50 µg de polissorbato 20/mL
Dipersão C1 = 0,83 mg/mL de óleo essencial, 0,45 µg de polissorbato 20/mL
D = Meio de cultura controle

Figura 37 - Dispersões do óleo essencial da *Minthostachys setosa* + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas

Dispersão A2 = 82,80 mg/mL de óleo essencial, 45,00 µg de polissorbato 20/mL

Dispersão B2 = 8,30 mg/mL de óleo essencial, 4,50 µg de polissorbato 20/mL

Dispersão C2 = 0,83 mg/mL de óleo essencial, 0,45 µg de polissorbato 20/mL

D = Meio de cultura controle

Figura 38 - Dispersões do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Cananéia) + polissorbato 20 + meio de cultura para as células (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas

Dispersão A3 = 77,11 mg/mL de óleo essencial, 45,00 µg de polissorbato 20/mL

Dispersão B3 = 7,71 mg/mL de óleo essencial, 4,50 µg de polissorbato 20/mL

Dispersão C3 = 0,77 mg/mL de óleo essencial, 0,45 µg de polissorbato 20/mL

D = Meio de cultura controle

Figura 39 - Dispersões do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Cataia) + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas

Dispersão A4 = 81,19 mg/mL de óleo essencial, 45,00 µg de polissorbato 20/mL
Dipersão B4 = 8,12 mg/mL de óleo essencial, 4,50 µg de polissorbato 20/mL
Dipersão C4 = 0,81 mg/mL de óleo essencial, 0,45 µg de polissorbato 20/mL
D = Meio de cultura controle

Figura 40 - Dispersões do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Morro Grande) + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas

Dispersão A5 = 102,70 mg/mL de óleo essencial, 45,00 µg de polissorbato 20/mL
 Dispersão B5 = 10,30 mg/mL de óleo essencial, 4,50 µg de polissorbato 20/mL
 Dispersão C5 = 1,03 mg/mL de óleo essencial, 0,45 µg de polissorbato 20/mL
 D = Meio de cultura controle

Figura 41 - Dispersões do óleo essencial da *Drimys brasiliensis* + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas

Dispersão A6 = 81,06 mg/mL de óleo essencial, 45,00 µg de polissorbato 20/mL
 Dispersão B6 = 8,11 mg/mL de óleo essencial, 4,50 µg de polissorbato 20/mL
 Dispersão C6 = 0,81 mg/mL de óleo essencial, 0,45 µg de polissorbato 20/mL
 D = Meio de cultura controle

Figura 42 - Dispersões do óleo essencial da bergamota + polissorbato 20 + meio de cultura (D10 e RPMI10) nos períodos de 24 e 48 horas

Diante desses resultados, o polissorbato 20 foi considerado como dispersante ideal dos óleos essenciais em meio de cultura devido à estabilidade das dispersões somada a sua baixa toxicidade (**Final Report** [...], 1984). Assim, ao utilizar as dispersões C1, C2, C3, C4, C5 e C6 como tomada

de ensaio para os testes biológicos, pode-se nessas condições garantir que os óleos essenciais estejam dispersos e em contato com as células.

Com o intuito de utilizar o corante MTS/PMS em substituição ao NR (OECD/GD 129, 2010; OECD 432, 2004) foi verificada a equivalência entre esses agentes colorimétricos por meio da análise estatísticas dos resultados de IC_{50} , obtidos nos testes de citotoxicidade do óleo essencial da bergamota, na linhagem BALB/3T3 clone A31. Os valores de IC_{50} tanto para o método com MTS/PMS quanto para o com NR, demonstrados na Tabela 5, foram calculados pelo Programa PHOTOTOX[®] (2013). Ressalta-se que, para o controle do polissorbato 20 em ambos os métodos não foi obtido o valor de IC_{50} , pois, a viabilidade celular foi superior a 90 %, refletindo dessa forma, a ausência de interferência na viabilidade celular do óleo essencial da bergamota.

Tabela 5 - Valores de IC_{50} (mg/mL) do óleo essencial de bergamota submetido aos métodos de detecção da viabilidade celular por MTS/PMs e NR em cinco experimentos independentes

Experimento	IC_{50} (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)
	MTS/PMS	NR
1	$0,325 \pm 0,006$	$0,314 \pm 0,005$
2	$0,309 \pm 0,004$	$0,326 \pm 0,005$
3	$0,186 \pm 0,011$	$0,230 \pm 0,009$
4	$0,190 \pm 0,002$	$0,182 \pm 0,001$
5	$0,232 \pm 0,005$	$0,229 \pm 0,002$

Esses valores de IC_{50} (Tabela 5) foram submetidos ao teste de equivalência TOST que, classificou os dois métodos como equivalentes. Na análise estatística o p -valor foi de 0,007 e para Δ de 20 % o valor foi de 0,05. Ressalta-se que, por se tratar de um ensaio biológico, o valor de Δ aplicado à análise estatística encontra-se adequado e em concordâncias também com os ensaios de bioequivalência que preconizam o valor de ± 20 e utilizam como reagente biológico participantes de pesquisa (LOURENÇO; PINTO, 2012; MUTH, 2006). Com relação aos valores médios da IC_{50} do óleo essencial de bergamota, para MTS/PMS foi de $0,2484 \pm 0,0056$ (mg/mL) e para NR foi de $0,2562 \pm 0,0044$ (mg/mL). Adicionalmente, verificou-se na literatura que Villa e colaboradores (2009) encontraram similaridade entre os valores de IC_{50} do óleo essencial da *Salvia somalensis* Vatke na linhagem celular NCTC 2544 de queratinócitos humanos normais, que corresponderam a $6,2940 \pm 0,2120$ (mg/mL) para MTT e $6,315 \pm 0,9835$ (mg/mL) para NR. Assim, devido à

equivalência demonstrada entre os métodos, o corante MTS/PMS foi eleito para a realização dos ensaios, visto que possui fácil manipulação quando comparado ao NR.

Nos ensaios de viabilidade celular em geral, a relação entre dose-resposta da maioria dos *endpoints* farmacológicos e toxicológicos, apresenta uma resposta não linear geralmente no formato sigmóide, que pode ser linearizada através da conversão logarítmica dos valores no eixo da abscissa. A determinação das concentrações de amostras testadas em progressão geométrica é também indicada, em detrimento da progressão aritmética, já que a mesma possibilita a distribuição igualitária dos pontos testados (NIH, 2001). Nesse contexto, segundo *APPENDIX F - Decimal Geometric Concentration Series* do *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*, a utilização de séries geométricas decimais permite que experimentos independentes possam ser comparados mesmo quando utilizadas concentrações diferentes.

Para a citotoxicidade na linhagem BALB/3T3 clone A31 foram realizados cinco ensaios independentes, com no mínimo duas concentrações iguais e as restantes diferentes, obtidas a partir de séries geométricas decimais, segundo o item 4.2.5. No óleo essencial da *Minthostachys setosa* (Figura 43), verificou-se que a concentração de 0,028 mg/mL, referente à CMI, apresentou viabilidade celular superior a 90 % tanto para 24 quanto para 48 horas. O mesmo ocorreu na concentração de 0,044 mg/mL, referente à CMI estimada da *Pimenta pseudocaryophyllus*, para os quimiotipos Cananéia (Figura 44), Cataia (Figura 45) e Morro Grande (Figura 46) em 24 e 48 horas. Para a *Drimys brasiliensis* (Figura 47) concentrações até 0,083 mg/mL nos ensaios em 24 e 48 horas promoveram a viabilidade celular superior a 90 %. Frente aos resultados, essas concentrações estudadas correspondem à concentração máxima não tóxica, segundo Castell e colaboradores (2000).

Figura 43 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da *Minthostachys setosa* por 24 (A) e 48 horas (B)

Figura 44 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cananéia por 24 (A) e 48 horas (B)

Figura 45 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cataia por 24 (A) e 48 horas (B)

Figura 46 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Morro Grande por 24 (A) e 48 horas (B)

Figura 47 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem BALB/3T3 clone A31 após a exposição ao óleo essencial da *Drimys brasiliensis* por 24 (A) e 48 horas (B)

De acordo com o *Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests* (OECD/GD 129, 2010), para que o ensaio seja considerado aceitável pelo menos uma das concentrações avaliadas devem apresentar citotoxicidade $> 0\%$ e $\leq 50\%$ de viabilidade celular, e citotoxicidade $> 50\%$ e $< 100\%$. Frente a esses parâmetros, foi verificado que as curvas dose-resposta (Figuras 43 a 47) possuem valores que estão em conformidade com os critérios de aceitabilidade. Desse modo, foi possível obter os valores de IC_{50} e o coeficiente de determinação (R^2) das curvas, para as amostras em contato com as células por 24 e 48 horas, Tabelas 6 e 7. Os valores de R^2 apresentaram valores médios maiores que 0,85 indicando que mais de 85% dos valores observados podem ser aplicados a esse modelo.

Tabela 6 - Valores de, R^2 das curvas e IC_{50} com suas respectivas médias e desvio padrão (DP) para óleos essenciais da *Minthostachys setosa*; *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande; e *Drimys brasiliensis*; para os cinco ensaios independentes com 24 horas de contato das amostras na linhagem BALB/3T3 clone A31

Óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i> – 24 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,4978	0,4726	0,5728	0,5501	0,4946	0,5176	0,0375
R^2	0,9838	0,9496	0,9829	0,8286	0,9227	-	-
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Cananéia – 24 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,5321	0,4294	0,5295	0,4612	0,4871	0,4879	0,0395
R^2	0,9348	0,8972	0,8134	0,6511	0,9783	-	-
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Cataia – 24 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,2061	0,3721	0,4793	0,4532	0,3707	0,3763	0,0954
R^2	0,9601	0,9567	0,9197	0,7427	0,9959	-	-
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Morro Grande – 24 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,4587	0,5155	0,3071	0,3071	0,2599	0,3697	0,0991
R^2	0,9845	0,9691	0,9568	0,9568	0,9802	-	-
Óleo essencial da <i>Drimys brasiliensis</i> – 24 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,1446	0,1609	0,1590	0,1599	0,1185	0,1486	0,0162
R^2	0,9671	0,8207	0,8309	0,8444	0,9236	-	-

Considerou-se um intervalo de confiança de 95%

Tabela 7 - Valores de, R^2 das curvas e IC_{50} com suas respectivas médias e desvio padrão (DP) para óleos essenciais da *Minthostachys setosa*; *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande; e *Drimys brasiliensis*; para os cinco ensaios independentes com 48 horas de contato das amostras na linhagem BALB/3T3 clone A31

Óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i> – 48 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,4886	0,4773	0,5521	0,5709	0,5105	0,5199	0,0361
R^2	0,9848	0,9937	0,9945	0,7091	0,7246	-	-
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Cananéia – 48 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,6393	0,4380	0,5701	0,3643	0,3015	0,4626	0,1257
R^2	0,9890	0,9162	0,9335	0,6893	0,8374	-	-
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Cataia – 48 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,2351	0,3644	0,5374	0,4699	0,3831	0,3980	0,1025
R^2	0,9937	0,9861	0,9353	0,8583	0,9416	-	-
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> quimiotipo Morro Grande – 48 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,4429	0,5290	0,3059	0,3061	0,2591	0,3686	0,1011
R^2	0,9962	0,9670	0,9620	0,9166	0,9837	-	-
Óleo essencial da <i>Drimys brasiliensis</i> – 48 horas							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média	DP
IC_{50}	0,1395	0,1175	0,1330	0,1180	0,1241	0,1384	0,0209
R^2	0,9673	0,8641	0,8776	0,8476	0,9173	-	-

Considerou-se um intervalo de confiança de 95%

A aplicabilidade dos valores de IC_{50} consiste em estimar a DL_{50} , ou seja, a dose de partida para verificar a letalidade aguda *in vivo* por meio do teste de toxicidade oral aguda em roedores. Conforme os guias de determinação da dose letal estimada por meio da citotoxicidade (OECD/GD 129, 2010; NIH, 2001; ICCVAM, 2006), o cálculo da DL_{50} é realizado com o valor da IC_{50} de 24 horas. Os valores obtidos de IC_{50} de 24 e 48 horas para cada amostra dos óleos essenciais foram submetidos à análise estatística, descrita no item 4.2.9, que apresentaram os valores de p -valor e diferença entre as médias conforme Tabela 8. Portanto, não houve diferença significativa considerando um intervalo de confiança de 95% e p -valor > 0,05. No entanto, foram considerados os valores médios de IC_{50} de 24 horas para o cálculo da DL_{50} , que resultou em: 1080,45 mg/kg para a *Minthostachys setosa*; 1056,96 mg/kg para o quimiotipo Cananéia; 956,62 mg/kg para o quimiotipo Cataia; 953,32 para o quimiotipo Morro Grande; e 679,19 mg/kg para *Drimys brasiliensis*.

Tabela 8 - Valores de p-valor e média das diferenças entre os valores de IC₅₀ 24 e 48 horas para os óleos essenciais da *Minthostachys setosa*; *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande; e *Drimys brasiliensis*

Amostra	p-valor (entre IC ₅₀ 24 e IC ₅₀ 48 horas)	diferença entre as Médias
<i>Minthostachys setosa</i>	0,7808	-0,002300
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> Cananéia	0,6524	0,025220
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> Cataia	0,1161	-0,021700
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> Morro Grande	0,8303	0,001060
<i>Drimys brasiliensis</i>	0,3922	0,010160

Para os valores estimados de DL₅₀ a partir do ensaio de citotoxicidade, o guia da OECD/GD 129 (2010) cita que a redução de 50 % dos animais ocorre com DL₅₀ > 5000 mg/kg. No entanto, a mesma referência cita Bulgheroni e colaboradores (2009) que, em estudo realizado para estimativa da toxicidade oral aguda de diversas substâncias químicas, os valores de DL₅₀ entre 300 e 2000 mg/kg foram classificados como categoria 4 e considerados seguros. Com essa classificação, pode-se considerar que todos os valores estimados de DL₅₀ dos óleos essenciais testados são seguros, permitindo a redução do número de animais, caso sejam realizados posteriores ensaios de toxicidade oral aguda *in vivo*. Com esse mesmo intuito, Hayes e Markovic (2002) realizaram o estudo toxicológico do óleo essencial da *Backhousia citriodora* e determinaram a DL₅₀, a partir dos valores de IC₅₀ obtidos no ensaio de citotoxicidade em culturas primárias de fibroblastos humanos, nas linhagens HepG2 de hepatocarcinoma e F1-73 de fibroblastos normais.

Apesar dos guias preconizarem o uso da linhagem celular BALB/3T3 clone A31 no ensaio de citotoxicidade a viabilidade celular depende, além da amostra, da linhagem a qual a célula foi desafiada. Assim, com intuito de gerar curvas de dose-resposta dos óleos essenciais em diferentes tipos celulares, foram realizados ensaios de citotoxicidade nas linhagens WS1 e CHO-K1. Foi verificado, que a viabilidade de no mínimo de 90 % das células CHO-K1 correspondeu às concentrações de: 0,167 mg/mL para *Minthostachys setosa* (Figura 48A); 0,125 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cananéia (Figura 48B); 0,103 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cataia (Figura 46C); 0,127 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Morro Grande (Figura 48D); e 0,014 mg/mL para *Drimys*

brasiliensis (Figura 48E). Esses valores de concentrações dos óleos essenciais foram utilizadas no ensaio do MNvit.

Figura 48 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem CHO-K1 após 24 horas de exposição aos óleos essenciais da *Minthostachys setosa* (A), da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia (B), Cataia (C), Morro Grande (D) e *Drimys brasiliensis* (E)

A linhagem celular WS1, demonstrou que a concentração de 0,37 mg/mL apresentou viabilidade celular abaixo de 50 % para todos os óleos essenciais. Entretanto, para a viabilidade celular acima de 90 % para as concentrações de 0,028 e 0,044 mg/mL, referentes respectivamente ao CMI da *Minthostachys setosa* e da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Figura 49), foram considerados adequados ao ensaio da atividade antioxidante intracelular.

R^2 das curvas: 0,6056 para *Minthostachys setosa*; 0,7877 para Cananéia; 0,8227 para Cataia; e 0,8963 para Morro Grande

Figura 49 - Porcentagem de viabilidade celular na linhagem WS1 após 24 horas de exposição aos óleos essenciais da *Minthostachys setosa*, da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia, Cataia e Morro Grande

Verifica-se que, dentre todas as linhagens celulares avaliadas, somente na curva dose-resposta da Figura 49, a concentração de 0,028 mg/mL da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cananéia em células WS1 apresentou viabilidade celular média em torno de 131 %. Esse efeito estimulador em baixas doses pode remeter ao conceito de hormese, *hormesis*, utilizado na área de toxicologia. Que consiste na relação dose-resposta que, provoca um efeito inibitório para doses elevadas e para doses baixas uma resposta estimulante, podendo ser verificada por meio de aumento no crescimento celular em 30 ± 60 % comparado ao controle (CALABRESE; BALDWIN, 2002). Segundo Calabrese e Baldwin (2001), a hormese pode gerar efeitos adaptativos e compensatórios nas células e nos organismos, após a ruptura na homeostase por agentes exógenos ou endógenos, como parte integrante da função fisiológica normal.

É importante destacar que o ensaio de citotoxicidade dos óleos essenciais nas células WS1 foi realizado por meio do corante derivado de sal tetrazólio MTT, que como descrito no item 2.3.1, é reduzido pelo complexo proteico citocromo-oxidase nas mitocôndrias de células viáveis. Assim, a hipótese da resposta estimulante obtida na concentração de 0,028 mg/mL do quimiotipo Cananéia em células WS1, pode ser baseada no aumento do estresse oxidativo das mitocôndrias que, resultou no aumento da citocromo-oxidase que por sua vez, reduziu mais sais de tetrazólio à formazana, gerando uma leitura de absorbância elevada, consequentemente, uma maior viabilidade. De acordo com Ristow e Zarse (2010), o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro da mitocôndria pode provocar uma reação adaptativa, que produz aumento da resistência ao estresse

e uma redução do estresse oxidativo em longo prazo, denominado hormese mitocondrial ou *mitohormesis*.

Frente ao exposto, há a suspeita da existência do fenômeno, entretanto há ainda a necessidade de mais estudos envolvendo especificamente concentrações $\leq 0,028$ mg/mL da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cananéia em células WS1 e em diferentes períodos de tempo. Assim, sugere-se que os ensaios de viabilidade celular sejam realizados por meio do uso de outros agentes colorimétricos com mecanismo de ação independente ao sistema citocromo oxidase, como por exemplo, o *Neutral Red* que conforme descrito no item 2.3.1, que se ligam à membrana lisossomal de células viáveis.

No ensaio de fototoxicidade foram obtidas curvas dose-resposta dos óleos essenciais (Figura 50) pelo programa PHTOTOTOX[®], assim como seus respectivos valores de *Photo Irradiation Fator* (PIF). O óleo essencial da bergamota, controle positivo, apresentou o PIF médio de 2,53 (Figura 51), considerado provavelmente fototóxico, de acordo com a classificação do guia OECD 432 (2004). O controle negativo LSS (lauril sulfato de sódio) e as amostras dos óleos essenciais apresentaram valores do PIF médio menores que 2, sendo então classificados como não fototóxicos (Figura 51).

*quimiotipos da *Pimenta pseudocaryophyllus* / exposição à luz UVA (■) / ao abrigo (■)

Figura 50 - Porcentagem de viabilidade das células BALB/3T3 clone A31 às diferentes concentrações em mg/mL após exposição à luz UVA e ao abrigo. As amostras avaliadas foram: *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), *Minthostachys setosa*, *Drimys brasiliensis*, LSS o lauril sulfato de sódio (controle negativo) e óleo de bergamota (controle positivo). Gráficos elaborados no programa PHOTOTOX®

(*) p -valor < 0,05 em intervalo de confiança de 95 %

PIF: Photo Irradiation Fator / **LSS:** lauril sulfato de sódio

Figura 51 - Valores de PIF das células BALB/ 3T3 clone A31 submetidas ao ensaio de fototoxicidade

Salienta-se que, os resultados do PIF foram submetidos à análise estatística ANOVA One-way e teste Bonferroni, descritos no item 4.2.9, que apresentou diferença estatística significativa entre os valores obtidos para o óleo essencial de bergamota, com p -valor < 0,05, comprovando seu potencial fototóxico quando comparado às demais amostras. Kejlová e colaboradores (2007), também avaliaram a fototoxicidade do óleo essencial de bergamota em células BALB/3T3 clone A31 e assim como no presente trabalho, para o solvente PBS os valores de PIF que apresentaram provável fototoxicidade foram entre 2,380 e 3,415. Corroborando com as afirmações, segundo Bakkali e colaboradores (2008), óleos essenciais, como a *Citrus bergamia*, possuem em sua composição química furanocumarinas que na ausência de luz são atóxicas, porém, na presença de luz UV podem promover reações tóxicas com a produção de ERO que em desequilíbrio com o metabolismo celular danificam proteínas, lipídeos de membrana e macromoléculas celulares, podendo resultar em danos genéticos.

Para a avaliação do potencial genotóxico das amostras dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), *Minthostachys setosa*, *Drimys brasiliensis* foi realizado o ensaio MNvit. As culturas foram tratadas com citocalisina B, citoB, que resultaram no bloqueio da citocinese e permitiram a contagem em lâminas da frequência relativa de células mononucleadas (CM), multinucleadas (CMu), binucleadas (CB) e a presença de micronúcleos (MN), Figura 52.

CM: célula mononucleada / **CB:** célula binucleada / **CMu:** célula multinucleada / **MN:** micronúcleo

Figura 52 - Células CHO-K1 submetidas ao teste MNvit e coradas com Giemsa Stain. Fotomicrografia obtida a partir da observação das lâminas ao microscópio óptico (Nikon 80I), nos aumentos de 10x (A) e 20x (B, C, D, E e F) da objetiva. (A) amostra benzopireno (BZP), presença de CM, CB, CM com um MN. (B) amostra BZP, presença de CB. (C) CB com MN. (D) amostra NaCl sem S9, presença de CB e CM com MN. (E) amostra NaCl sem S9, presença de CM, CMu, CB e uma CB com dois MN. (F) amostra NaCl com S9, presença de CB com um MN e grânulos

Fenech (2007) cita que o bloqueio da citocinese é um método abrangente para medir a proliferação celular, a citostase, a atividade citotóxica e os danos no DNA. Essas alterações por sua vez, são marcadas especificamente nas CB que podem incluir marcadores de alterações cromossômicas, os MN, que foram então contabilizados. Segundo o guia da OECD 487 (2010), os valores de CBPI e RI (Tabela 9) indicam respectivamente, o número médio de ciclos que cada célula sofre após exposição à citocalasina B e a citostase ou a atividade citotóxica.

Tabela 9 - Médias do CBPI (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*) e RI (*Replication Index*) das amostras com e sem S9 dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), *Minthostachys setosa*, *Drimys brasiliensis*, controle de células, NaCl, benzo[α]pireno, colchicina e mitomicina C

Amostra	sem S9		com S9	
	CBPI	RI (%)	CBPI	RI (%)
	($\pm$ erro)	($\pm$ DP)	($\pm$ erro)	($\pm$ DP)
Controle de células	1,76 $\pm$ 0,01	-	1,75 $\pm$ 0,01	-
Controle negativo NaCl	2,85* $\pm$ 0,01	119,89 $\pm$ 11,20	2,70 $\pm$ 0,01	99,49 $\pm$ 18,15
Controle clastogênico mitomicina C	1,66 $\pm$ 0,01	86,90 $\pm$ 5,45	-	-
Controle clastogênico benzo[α]pireno	-	-	2,67 $\pm$ 0,01	101,73 $\pm$ 3,27
Controle aneugênico colchicina	2,73* $\pm$ 0,01	112,21 $\pm$ 8,46	-	-
Controle do polissorbato 20	1,77 $\pm$ 0,01	100,98 $\pm$ 0,27	2,26 $\pm$ 0,01	102,44 $\pm$ 3,87
<i>P. pseudocaryophyllus</i> , Cananéia	1,79 $\pm$ 0,01	103,9 $\pm$ 5,78	2,65 $\pm$ 0,01	102,25 $\pm$ 1,00
<i>P. pseudocaryophyllus</i> , Morro Grande	1,77 $\pm$ 0,01	100,85 $\pm$ 3,55	2,27 $\pm$ 0,01	106,30 $\pm$ 5,55
<i>P. pseudocaryophyllus</i> , Cataia	1,67 $\pm$ 0,01	88,07 $\pm$ 9,47	2,14 $\pm$ 0,01	88,98 $\pm$ 4,58
<i>Minthostachys setosa</i>	1,57 $\pm$ 0,01	75,06 $\pm$ 18,64	2,21 $\pm$ 0,01	96,40 $\pm$ 8,74
<i>Drimys brasiliensis</i>	1,70 $\pm$ 0,01	91,79 $\pm$ 4,73	2,33 $\pm$ 0,01	115,30 $\pm$ 4,73

(*) p -valor < 0,05 / **DP**: desvio padrão

Verifica-se na Tabela 9, os valores de CBPI e os erros obtidos pelo modelo estatístico *Poisson* (MARGOLIN *et al.*, 1986), que foram de 0,01 para todas as amostras, comprovando dessa forma, que houve homogeneidade entre as leituras das lâminas (item 4.2.7). Pela análise estatística ANOVA One-way e teste de Dunett's, item 4.2.9, para amostras com S9 foi verificado que os resultados de CBPI quando comparados ao respectivo controle de células, não houve aumento no número de ciclos dessas amostras, pois, não apresentaram diferença estatística significativa, com p -valor > 0,05. Para a análise estatística dos valores de CBPI sem S9, também comparados a seu respectivo controle de células, verificou-se a diferença estatística significativa com p -valor <

0,05 para NaCl e colchicina, comprovando que houve um aumento no número de ciclos dessas amostras.

Segundo Parry e Sors (1993), para o controle positivo colchicina é esperado o efeito aneugênico por meio de alterações no número de cromossomos e consequente alteração no ciclo celular (não disjunção). O CBPI obtido de $2,73 \pm 0,01$ para esse controle positivo sugere-se que não houve mudança no ciclo celular quando comparado às demais amostras, apresentando efeito não esperado com o aumento no número de ciclos celulares. De acordo com Kirsch-Volders e colaboradores (1997), a colchicina pode apresentar expressivas alterações cromossômicas proporcionais ao aumento das concentrações avaliadas. Nessa pesquisa, os autores identificaram que na avaliação do potencial genotóxico, concentrações entre 0,025 e 0,038 μM apresentaram a frequência de aproximadamente 50 % de não disjunção. Frente a esse comportamento da colchicina, verificou-se que a concentração testada de 0,08 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde 0,02 μM , não foi suficiente na expressão de efeitos aneugênicos.

Com relação aos valores de RI, Tabela 9, foi verificada na análise estatística que as amostras com e sem S9, quando comparadas a seus respectivos controle de células, não apresentaram diferença estatística significativa com $p\text{-valor} > 0,05$. De acordo com o OECD 487 (2010), o RI é uma forma de comparação do número de células binucleadas, multinucleadas e o total de células que se encontram em processo de divisão. Valores de RI de $50 \pm 5\%$ podem provocar danos cromossômicos como efeito secundário à citotoxicidade, assim quanto maior o RI, menor será a quantidade de células citostáticas, consequentemente, menor será a citotoxicidade da amostra. Na Tabela 9, para todas as amostras os valores de RI foram superiores a 50 % resultando em baixas quantidades de células citostáticas, garantindo a integridade celular durante o ensaio.

De acordo com Diaz e colaboradores (2007), a formação de MN é uma característica da toxicidade genética, e o ensaio MNvit é uma ferramenta importante para a triagem desse atributo. Assim, nesse trabalho foi avaliado o potencial genotóxico das amostras com e sem S9, por meio da porcentagem da frequência de MN, Figura 53.

(*) p -valor < 0,05

MN micronúcleo / **CC** controle de células / **NaCl** cloreto de sódio / **Tw20** polissorbato 20 / **BZP** benzo[α]pireno / **Colch** colchicina / **MTMC** mitomicina C / **Can** Cananéia / **MG** Morro Grande / **Cat** Cataia / **Mset** *Minthostachys setosa* / **Db** *Drimys brasiliensis*

Figura 53 – Média da porcentagem da frequência de MN na linhagem CHO-K1 expostas aos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), *Minthostachys setosa*, *Drimys brasiliensis*, controle de células, NaCl, benzo[α]pireno, colchicina e mitomicina C. (A) amostras sem S9. (B) amostras com S9

Na análise estatística ANOVA One-way e teste Bonferroni, item 4.2.9, para as amostras sem S9 foi verificado que todos os resultados da porcentagem da frequência de micronúcleo (% FMN) quando comparados entre si, apresentaram diferença estatística significativa com p -valor < 0,05 para a mitomicina C (MTMC), referente ao controle positivo clastogênico. Na análise da % FMN entre as amostras sem S9, verificou-se diferença estatística significativa com p -valor < 0,05 para o benzo[α]pireno (BZP), controle positivo clastogênico.

Segundo Diaz e colaboradores (2007), na análise da % FMN foram considerados como resultados positivos aqueles que apresentaram diferença estatística significativa com p -valor < 0,05 e quando comparados ao controle corresponderam a um aumento ≥ 3 vezes na % FMN. Os mesmos autores classificaram como um resultado “fracamente positivo” aqueles que, além da diferença estatística significativa (p -valor < 0,05), quando comparados ao controle corresponderam a um aumento ≥ 2 vezes e aumento < 3 vezes na % FMN.

Frente a essa recomendação, verificou-se nas amostras sem S9 que, somente a MTMC foi classificada como positiva, pois, sua % FMN apresentou um aumento de 5 vezes, quando comparada a seu respectivo controle de células (CC), valor esse calculado a partir dos valores médios das % FMN de 5 % para a MTMC e 0,93 % para o CC. Para as amostras com S9, somente o BZP foi classificado como fracamente positivo, uma vez que, o valor médio da % FMN

apresentou um aumento de 2 vezes, quando comparado ao seu respectivo CC, calculado a partir das médias da % FMN de 2,3 % para a MTMC e 1,14 % para o CC.

De acordo com o guia da OECD 487 (2010), um resultado positivo no ensaio MNvit indica que a substância induz a perda de quebras cromossômicas. Um resultado negativo indica que, nas condições de ensaio utilizadas, a substância em estudo não induz quebras cromossômicas e / ou de ganho ou perda de células de mamíferos em cultura. Portanto, nesse presente trabalho, foram considerados como resultados como potencialmente genotóxicos, a MTMC e o BZP, e como potencialmente não genotóxicos as amostras dos óleos essenciais *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), *Minthostachys setosa* e *Drimys brasiliensis*.

Salienta-se que, o guia da OECD 487 (2010) recomenda a avaliação de pelo menos três concentrações no ensaio do MNvit. Considerando que, as concentrações desses óleos essenciais candidatos a conservante natural em cosméticos, como já discutido, compreendem valores referente à concentração inibitória mínima (CMI) de 0,028 para a *Minthostachys setosa* e 0,044 para a *Pimenta pseudocaryophyllus*. Assim, as concentrações analisadas no ensaio do MNvit foram no mínimo duas vezes maiores aos valores de CMI e, compreenderam no mínimo 90 % de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade, na linhagem CHO-K1. Para o óleo essencial da *Drimys brasiliensis*, em consonância com as demais amostras, também foi avaliada a concentração que apresentou no mínimo 90 % de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade, dada a ausência do valor de CMI para esse óleo essencial.

Com o intuito de complementar os resultados obtidos no teste do MNvit pelo método clássico de leituras de lâminas foi realizado o ensaio de MNvit por citometria de fluxo. Segundo Nüsse e Marx (1997), a citometria de fluxo quando comparada as outras técnicas de imagem, possui a vantagem de que um grande número de micronúcleos pode ser medido em intervalos de tempo curtos.

O ensaio do MNvit por citometria de fluxo realizado nesse trabalho, foi baseado no estudo de Bryce e colaboradores (2007) de incorporar os agentes fluorescentes SYTOX[®] Green e EMA (*ethidium monoazide*). Esse último marca a cromatina de células necróticas e apoptóticas, durante os estágios intermediário e final do desenvolvimento celular. Adicionalmente, a remoção das membranas citoplasmáticas permitiu a marcação de núcleos livres, em suspensão, e de MN após adição do fluorocromo SYTOX[®] Green.

A estratégia realizada para determinar a população celular baseou-se nos critérios descritos por Bryce e colaboradores (2007) para isolar os núcleos e micronúcleos. Ressalta-se que, a incidência de

micronúcleo foi determinada por meio da aquisição de pelo menos 10.000 eventos por amostra na região das células nucleadas. A Figura 54 mostra a estratégia utilizada com os histogramas obtidos durante a aquisição dos eventos do controle de células, que foram aplicados também para as amostras dos óleos essenciais e aos os controles positivos e negativos.

Figura 54 - Histogramas do controle de células sem S9, com a estratégia para determinar a população celular de CHO-K1 para isolar os núcleos (N), núcleos com hipodiploidia (H) e micronúcleos (MN)

Os histogramas, Figura 54, ilustram a estratégia utilizada para isolar os núcleos e micronúcleos. Para que esses fossem marcados como eventos, precisaram atingir cada um dos seguintes critérios: dentro de uma dispersão lateral *versus* região dispersão frontal (Figura 54A); dentro de uma região que exclui *doublets* (Figura 54B); pelo menos 1/100 da fluorescência associada SYTOX[®] Green como núcleos G1 (Figura 54C); dentro de uma dispersão frontal *versus* SYTOX[®] Green região de fluorescência (Figura 54D); dentro de uma dispersão lateral *versus* região SYTOX[®] Green fluorescência (Figura 54E); EMA-negativo (Figura 54F).

Essa estratégia resultou no histograma (Figura 54G) que quantificou a incidência de núcleos (N), micronúcleos (MN) e hipodiploidia (H), que corresponde a núcleos que perderam parte do número de cromossomos, possivelmente micronúcleos. Estes eventos fechados apresentaram dispersão de luz e de fluorescência características de células saudáveis. Dessa forma, foi possível quantificar a porcentagem micronúcleos a cada 10.000 eventos adquiridos, Figura 55.

(*) p -valor < 0,05

MN micronúcleo / CC controle de células / NaCl cloreto de sódio / Tw20 polissorbato 20 / BZP benzo[α]pireno / Colch colchicina / MTMC mitomicina C / Can Cananéia / MG Morro Grande/ Cat Cataia / Mset *Minthostachys setosa* / Db *Drimys brasiliensis*

Figura 55 - Porcentagem de micronúcleo das células CHO-K1 submetidas às amostras com e sem S9, por citometria de fluxo

Na análise estatística ANOVA One-way e teste Bonferroni, item 4.2.9, para as amostras sem S9 foi verificado que todos os resultados da porcentagem de micronúcleo (% MN) a cada 10.000 eventos, quando comparados entre si apresentaram diferença estatística significativa com p -valor < 0,05 para a mitomicina C (MTMC), referente ao controle positivo clastogênico. Na análise da % MN entre as amostras sem S9, verificou-se diferença estatística significativa com p -valor < 0,05 para o benzo[α]pireno (BZP), controle positivo clastogênico.

Bryce e colaboradores (2011), em pesquisa dos valores da % MN em células CHO-K1 encontrados na literatura determinaram que, a MTMC em 4 µg/mL possui % MN médio de 5,58 (n = 22) e o controle do solvente DMSO, 1% (v/v), possui valor de % MN médio de 0,75 (n = 102). Nesse mesmo estudo foi obtido o valor médio de 4,6 % de MN para 0,3 µM de MTMC (n = 22) e 1,7 % para 0,025 µM de colchicina (n = 22). Avlaservich e colaboradores (2006) encontraram o valor acima de 4 % de MN para 3 µg/mL de BZP na linhagem L5178Y por meio também da citometria de fluxo.

Com relação aos resultados obtidos nesse presente trabalho, foi verificado que os valores médios da % de MN dos controles positivos, com e sem S9, foram de: 3,25 (n = 3) para MTMC para 0,05 µg/mL, ou 0,01 µM; 0,96 (n = 3) para 0,02 µM de colchicina; e 3,59 para 0,06 µM, ou 3 µg/mL, de BZP (n = 3). Dessa forma, os valores obtidos para % de MN nesse experimento se aproximaram dos valores encontrados na literatura, apesar do número de réplicas terem sido menores.

Com base na classificação de Diaz e colaboradores (2007), os controles MTMC e BZP quando comparados ao controle de células (CC) foram considerados positivos para genototoxicidade. Pois, os valores médios da % de MN além de apresentarem diferença estatística significativa com *p*-valor < 0,05, foram no mínimo 3,8 vezes maiores que o controle de células.

Com relação à distribuição das fases do ciclo celular, especificamente na interfase quando há intenso metabolismo celular, foram identificadas as fases subG1, G1, S e G2. Na Figura 56, verifica-se o modelo do histograma de fluorescência do SYTOX[®] Green (FITC-A), que foi utilizado para quantificar a distribuição do ciclo celular dos núcleos viáveis da amostra de controle de células sem S9. Esse histograma foi também aplicado às demais amostras dos óleos essenciais e aos controles positivos e negativos.

Figura 56 - Histograma da distribuição quantitativa das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) do ciclo celular do controle de células sem S9

Como citado no item 2.3.3 da revisão da literatura, apesar dos micronúcleos serem formados durante a mitose, mesmo que não tenha havido dano cromossômico durante o ciclo, os micronúcleos analisados no teste do MNvit são de células em interfase (FENECH, 2007). Devido à importância dessa análise, foi verificada distribuição dos núcleos de células viáveis em cada fase do ciclo subG1, G1, S e G2, assim considerou-se a média da % de cada uma dessas fases para cada amostra, sem e com S9. Após análise estatística ANOVA One-way e teste Bonferroni, item 4.2.9, verificou-se que não houve diferença estatística (p -valor < 0,05) no intragrupo sem S9 e no intragrupo com S9. Uma vez que, os micronúcleos são formados durante a interfase, esses resultados demonstram que houve homogeneidade entre as fases garantindo a confiabilidade do ensaio.

Com relação a fase sub-G1 (Figura 57), que corresponde à fase pré-interfase, essa apresentou os valores entre 12 e 20 % para as amostras sem S9 e para aquelas com S9 os valores entre 14 e 25 %. Correspondendo a fase de ativação metabólica e condensação dos cromossomos, a fase G1 (Figura 58) apresentou os intervalos de 21 a 44 % para as amostras sem S9 e de 26 a 46 % para as com S9. Na figura 59, referente à fase S responsável pela replicação do DNA, verificou-se que entre as amostras sem S9 os valores foram entre 7,5 e 18 % e para as amostras com S9 os valores foram de 6,5 a 17 %. A fase G2 (Figura 60), que antecede a mitose, ocorre o crescimento celular e a intensa produção de proteínas responsáveis pela mitose, apresentaram valores entre 24 e 44 % para as amostras sem S9 e de 23 a 30 % para as amostras com S9.

CC controle de células / NaCl cloreto de sódio / Tw20 polissorbato 20 / BZP benzo[α]pireno / Colch colchicina / MTMC mitomicina C / Can Cananéia / MG Morro Grande/ Cat Cataia / Mset *Minthostachys setosa* / Db *Drimys brasiliensis*

Figura 57 - Porcentagem da distribuição da fase subG1 das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo

CC controle de células / NaCl cloreto de sódio / Tw20 polissorbato 20 / BZP benzo[α]pireno / Colch colchicina / MTMC mitomicina C / Can Cananéia / MG Morro Grande/ Cat Cataia / Mset *Minthostachys setosa* / Db *Drimys brasiliensis*

Figura 58 - Porcentagem da distribuição da fase G1 das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo

CC controle de células / **NaCl** cloreto de sódio / **Tw20** polissorbato 20 / **BZP** benzo[α]pireno / **Colch** colchicina / **MTMC** mitomicina C / **Can** Cananéia / **MG** Morro Grande/ **Cat** Cataia / **Mset** *Minthostachys setosa* / **Db** *Drimys brasiliensis*

Figura 59 - Porcentagem da distribuição da fase S das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo

CC controle de células / **NaCl** cloreto de sódio / **Tw20** polissorbato 20 / **BZP** benzo[α]pireno / **Colch** colchicina / **MTMC** mitomicina C / **Can** Cananéia / **MG** Morro Grande/ **Cat** Cataia / **Mset** *Minthostachys setosa* / **Db** *Drimys brasiliensis*

Figura 60 - Porcentagem da distribuição da fase G2 das células CHO-K1 submetidas as amostras sem S9 (A) e com S9 (B), no teste MNvit por citometria de fluxo

Diante da confiabilidade apresentada na condução do teste, na avaliação dos resultados obtidos para os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (quimiotipos Cananéia, Morro Grande e Cataia), *Minthostachys setosa* e *Drimys brasiliensis* verificou-se que, não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados com controle de células, p -valor >

0,05. Portanto os óleos essenciais foram considerados potencialmente não genotóxico. É importante ressaltar que esses resultados corroboram com aqueles obtidos pelo ensaio do MNvit pelo método clássico de leitura de lâminas.

Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante intracelular foi realizado o ensaio por citometria de fluxo. Conforme citado no item 2.4, esse ensaio se fundamenta na determinação de ERO intracelular que oxida a diclorofluoresceína derivada da sonda de diacetato de diclorofluoresceína, emitindo fluorescência que, por sua vez é quantificada. A formação dessa espécie deve-se a presença de substâncias que provocam a mudança no microambiente celular conduzindo a esse fenômeno.

A estratégia para aquisição dos eventos de células com fluorescência foi por meio da formação de três *gatings*: amostras (R1); controle de células sem sonda (R2); e controle de células com sonda (R3). Assim, foi possível calcular a quantidade de ERO relativo das amostras. Segundo Frade e colaboradores (2010), valores de ERO menores que 1, correspondem a atividade antioxidante ideal proporcionada à célula pela amostra.

Na Figura 61, verifica-se a baixa produção de ERO em todos os óleos essenciais avaliados na concentração de 0,028 e 0,044 mg/mL. Para os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia (Figura 61A) e Morro Grande (Figura 61B), foram verificados por meio da análise estatística ANOVA One-way e teste Dunett's, item 4.2.9, que essas concentrações quando comparadas ao controle de células (CC), apresentaram diferença estatística significativa com *p*-valor > 0,05.

(*) p -valor < 0,05
CC controle de células

Figura 61 - Produção de ERO nas células WS1 expostas às amostras dos óleos essenciais da planta *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia (A), Morro Grande (B) e Cataia (C) e da planta *Minthostachys setosa* (D)

Scotti e colaboradores (2007) citaram que, os vegetais são ricos em substâncias antioxidantes devido ao processo evolutivo da espécie como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação UV. Diversos extratos vegetais quando aplicados em modelos animais ou cultura de células neutralizam a reatividade dos radicais livres, diminuindo lesões celulares. Dentre essas substâncias com atividade biológica, Jaganathan e Supriyanto (2012) em estudo de revisão citam que o eugenol possui expressiva atividade antioxidante.

Entre os agentes antioxidantes presentes nos óleos essenciais avaliados nesse estudo, destaca-se o eugenol, composto majoritário presente em 31,5 % e 19,6 % do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia Morro Grande, respectivamente. Para os óleos

essenciais do quimiotipo Cataia esse composto está presente em 17,9 % e no da planta *Minthostachys setosa* encontra-se ausente. Assim a atividade antioxidante da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia Morro Grande quando comparados ao controle, apresentou a elevada atividade antioxidante intracelular sugerindo esse comportamento ao eugenol.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho permitiram concluir que:

- A dispersão dos óleos essenciais da *Minthostachys setosa*, *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Drimys brasiliensis* foram obtidas por meio do uso do tensoativo polissorbato 20.
- Os métodos de detecção da viabilidade celular com o uso dos corantes MTS/PMS e NR foram considerados equivalentes para o óleo de essencial de bergamota.
- Os valores médios de IC₅₀ para 24 horas para a linhagem celular BALB/3T3 clone A31, foram de 0,5176 mg/mL para *Minthostachys setosa*; 0,4879 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cananéia; 0,3763 mg/mL *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cataia; 0,3697 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Morro Grande; e 0,1486 mg/mL *Drimys brasiliensis*. Assim, os óleos essenciais da *Minthostachys setosa* e da *Pimenta pseudocaryophyllus* não apresentaram toxicidade nos valores referentes à concentração mínima inibitória (CMI) de 0,028 e 0,04 mg/mL, respectivamente.
- Na avaliação da citotoxicidade para as linhagens CHO-K1 e WS1, os óleos essenciais da *Minthostachys setosa* e da *Pimenta pseudocaryophyllus* não apresentaram toxicidade nos valores referentes à CMI. Para a *Drimys brasiliensis* valores acima de 0,014 mg/mL apresentaram a porcentagem de viabilidade celular acima de 90 % na linhagem CHO-K1.
- Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, *Minthostachys setosa* e *Drimys brasiliensis* apresentaram *Photo Irradiation Fator* (PIF) médio menores que 2, sendo então classificados como não fototóxicos.
- No teste do Mvit clássico de leitura das lâminas e por citometria de fluxo nas concentrações de 0,167 mg/mL para *Minthostachys setosa*; 0,125 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cananéia; 0,103 mg/mL para *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo Cataia; 0,127 mg/mL *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipo para Morro Grande; e 0,014 mg/mL para *Drimys brasiliensis*, apresentaram-se potencialmente não genotóxico.
- Para a atividade antioxidante intracelular na linhagem celular WS1, os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia e Morro Grande, demonstraram potencial atividade antioxidante nas concentrações estudadas de 0,028 e 0,044 mg/mL.

REFERÊNCIAS

- AARONSON, S.A.; TODARO, G.J. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. **Journal of Cellular Physiology**, v. 72, n. 2, p. 141-148, 1968.
- ABREU, D.C.A. **Caracterização morfológica dg frutos e sementes e germinação de *Allophylus edulis* (Sf. Hil.) Radfk. e *Drimys brasiliensis* Miers**. Curitiba, 2002. 89 p. Dissertação de Mestrado - Engenharia Florestal - Universidade Federal do Paraná.
- ABREU, D.C.A.; KUNIYOSHI, Y.S.; MEDEIROS, A.C.S.; NOGUEIRA, A.C. Caracterização morfológica de frutos e sementes de Cataia (*Drimys brasiliensis* Miers. - Winteraceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 67-74, 2005.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry**. ed. 4. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.211, de 14 de julho de 2005**. Estabelece a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, conforme Anexo I e II desta resolução e dá outras definições. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/dfa9b6804aee482bb7a1bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+211%2C+de+14+de+julho+de+2005.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 13 jan. 2013.
- _____. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da Reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K. JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. Tradução: ANDRADE, A.E.B.; TERMIGNONI, C.; NUNES, C.P.; SCHNEIDER, C.Z.; MACHADO, D.C.; RENARD, G.; CHIES, J.A.B.; ASTARITA, L.V.; SCHEIBE, R.M. Porto Alegre, RS: Artmed® Editora S.A., 2011. 3 ed., 844p.
- ALMEIDA, D.C.G. Ciclo celular. In: MALDONADO, C.P.; CURI, R., coords. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 25-29.
- ALMEIDA, D.C.G.; BOAVENTURA, M.F.C. Fases do crescimento celular – curva de crescimento. In: MALDONADO, C.P.; CURI, R., coords. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 35-37.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **BALB/3T3 clone A31 (ATCC®, CCL-163™)**. Disponível em: <http://www.atcc.org/en/Products/Quality_Control_Strains/By_Organization_Company/CCL-163.aspx#11F1A8C17A7A4FB8A36940C154A9B585>. Acesso em: 04 abr. 2013a.
- _____. **CHO-K1 (ATCC®, CCL-61™)**. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx#11F1A8C17A7A4FB8A36940C154A9B585>>. Acesso em: 04 abr. 2013b.

- _____. **WS1 (ATCC[®], CRL-1502TM)**. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1502.aspx#11F1A8C17A7A4FB8A36940C154A9B585>>. Acesso em: 04 abr. 2013c.
- ARAÚJO, J.M.A.; FARIAS, A.P.S.F. Redução do teor de limoneno e bergapteno do óleo essencial de bergamota adsorvido em sílica gel pelo CO₂ – supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 112-115, 2003.
- AVERY, S.V. REVIEW ARTICLE: Molecular targets of oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 434, p. 201-210, 2011.
- AVLASEVICH, S.L.; BRYCE, S.M.; CAIRNS, S.E.; DERTINGER, S.D. *In vitro* micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p. 56-66, 2006.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; BABY, A.R.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.
- BARLTROP, J.A.; OWEN, T.C. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 611-614, 1991.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127-152, 2005.
- BIODIVERSITAS. Conservação de Espécies. Flora Brasileira. Documentos de Apoio. **Lista da Flora Ameaçada de Extinção com ocorrência no Brasil - IUCN**. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/listas_flora.asp>. Acesso em: 14 mar. 2013a.
- _____. Conservação de Espécies. Flora Brasileira. Documentos de Apoio. Lista da Flora Ameaçada de Extinção de Minas Gerais. **Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais**. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/MG-especies-ameacadas.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2013b.
- _____. Conservação de Espécies. Flora Brasileira. Documentos de Apoio. Lista da Flora Ameaçada de Extinção de São Paulo. **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/SP-especies-ameacadas.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2013c.
- BONDESSON, I.; EKWALL, B.; HELLBERG, S.; ROMERT, L.; STENBERG, K.; WALUM, E. MEIC-a new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of *in vitro* cytotoxicity tests. **Cell Biology and Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 331-347, 1989.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, p. 119-124, 1985.
- BOUILLON, C. **Skin a living envelope**. Paris: Gallimard, 2002. 127p. (Découvertes Gallimard).

BRASIL. Congresso Nacional. **Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0204/204754.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2013.

_____. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010a. 904p., 2v/il.

_____. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010b. 546p., 1v/il.

_____. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Portaria MCTI n. 491, de 3 de julho de 2012**. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. Disponível em: <<http://www.mcti.gov.br/index.php/content/view/340586.html>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

_____. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Decreto n.6.899, de 15 de julho de 2009**. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei n o 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0204/204755.pdf>. Acesso em: 20 jan.2012.

_____. Presidência da República. **Lei Federal n. 9.605, 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm>. Acesso em: 13 jan. 2013.

BRÄUCHLER, C.; MEIMBERG, H.; HEUBL, G. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) - taxonomy, biogeography and conflicts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 55, p. 501-523, 2010.

BROCHINI, C.B.; LAGO, J.H.G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 266-270, 2007.

BRYCE, S.M.; AVLASEVICH, S.L.; BEMIS, J. C.; DERTINGER, S.D. Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 280-286, 2011.

BRYCE, S.M.; BEMIS, J.C.; AVLASEVICH, S.L.; DERTINGER, S.D. *In vitro* micronucleus assay scored by cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. **Mutation Research**, 630 (1-2), p. 78-91, 2007.

BULGHERONI, A.; KINSNER-OVASKAINEN, A.; HOFFMANN, S.; HARTUNG, T.; PRIETO, P. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 16-19, 2009.

BURKE, B.; ELLENBERG, J. Remodelling the walls of the nucleus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 487-497, 2002.

- BUTTKE, T.M.; MCCUBREY, J.; OWEN, T.C. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. **Journal of Immunological Methods**, v. 157, p. 233-240, 1993.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Defining hormesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 21, p. 91-97, 2002.
- _____. The Frequency of U-Shaped Dose Responses in the Toxicological Literature. **Toxicological Sciences**, v. 62, p. 330-338, 2001.
- CANOVA, S.; VIEZZER, C.; NAVAIZO, L.; REVOLTELLA, R.; CELOTTI, L. Metabolic activation of benzo[*a*]pyrene in two fetal mouse hepatocyte lines: induction of DNA adducts and micronuclei. **Mutation Research**, v. 367, p. 135-141, 1996.
- CARDOSO, E.M.; ALVES, I.P.; LIMA, J.M.; TAHUATA, L.; HEILBRON-FILHO, P.F.; BRAZ, C.; PESTANA, S. **Apostila educativa radioatividade**. Rio de Janeiro: CNEN, 2010. 19 p. Disponível em: <<http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2013.
- CARRANO, A.V.; THOMPSON, L.H.; STRETKA, D.G.; MINKLER, J.L.; FRONG, S. DNA crosslinking sister chromatid exchange and specific locus mutation. **Mutation Research**, v. 63, p. 175-88, 1979.
- CARRERA, G.V.S.M.; FRADE, R.F.M.; AIRES-DE-SOUSA, J.; AFONSO, C.A.M.; BRANCO, L.C. Synthesis and properties of new functionalized guanidinium based ionic liquids as non-toxic versatile organic materials. **Tetrahedron**, v. 66, p. 8785-8794, 2010.
- CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHÓN, M. J.; PONSODA, X. In Vitro toxicity testing. In: DOYLE, A., GRIFFITHS, J. B. **Cell and Tissue Culture for Medical Research**. New York: Wiley-Liss, 2000. cap. 5.6, p. 403-409.
- CHAPMAN, G.V. Instrumentation for flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 3-12, 2000.
- COLLINS, J.E.; ELLIS, P.C.; WHITE, A.T.; BOOTH, A.E.G.; MOORE, C.E.; BURMAN, M.; REES, R.W.; LYNCH, A.M. Evaluation of the Litron *In Vitro* MicroFlow[®] Kit for the flow cytometric enumeration of micronuclei (MN) in mammalian cells. **Mutation Research**, 654, p. 76-81, 2008.
- CORFIELD, V.A.; HAY, R.J. Effects of cystine or glutamine restriction on human diploid fibroblasts in culture. **In Vitro**, v.14, n. 9, p. 787-794, 1978.
- CORRÊA, D.S.; TEMPONE, A.G.; REIMÃO, J.Q.; TANIWAKI, N.N.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; SARTORELLI, P.; MECCHI, M.C.; LAGO, J.H. Anti-leishmanial and anti-trypansomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitology Research**, v. 109, p. 231-236, 2011.
- COSTA, P.R.R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.
- CUNHA, A.P.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Fármacos aromáticos (plantas aromáticas e óleos essenciais). In: CUNHA, A.P., coord. **Farmacognosia e fitoquímica**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. p. 341-412.

- CURI, R.; MARTINS, K.A. Cultura de células: história e perspectivas. In: MALDONADO, C.P.; CURI, R., coords. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2005. p. 3-4.
- CUSTÓDIO, D.L.; BURGO, R.P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A.M.; REZENDE, M.I.; DANIEL, J.F.S.; PINTO, J.P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T.J. Antimicrobial activity of essential oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6: p. 1363-1369, 2010.
- DE FEO, V.; RICARDI, A.; BISCARDI, D.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb). Epl. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 61-65, 1998.
- DIAZ, D.; SCOTT, A.; CARMICHAEL, P.; SHI, W.; COSTALES, C. Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 630, p. 1-13, 2007.
- DOGNINI, J. **Estudo químico e avaliação da atividade antibacteriana deconstituintes voláteis de *Drimys angustifolia* e *Piper xylosteoides***. 2012. 107 p. Dissertação de Mestrado em Química - Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Naturais - Universidade Regional de Blumenau.
- DOHERTY, A.T.; ELLARD, S.; PARRY, E.M.; PARRY, J.M. An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. **Mutagenesis**, v. 11, p. 247-274 1996.
- DOHERTY, G.; McMAHON, H.T. Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 65-95, 2008.
- ECVAM DB-ALM: *INVITTOX* protocol. **3T3 NRU Phototoxicity Assay. INVITTOX nº 78**, 21p., 2008.
- 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. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 665-673, 1999.
- ESTEVES-PEDRO, N.M.; RODAS, A.C.D.; DAL BELO, C.A.; OSHIMA-FRANCO, Y.; SANTOS, M.G.; LOPES, P.S. Implementation of the Three Rs in the Human Hazard Assessment of Brazilian Medicinal Plants: an Evaluation of the Cytotoxic and Genotoxic Potential of *Dipteryx alata* Vogel. **ATLA**, v. 39, p. 189-196, 2011.
- EUROPEAN COMMISSION. **7th Amendment to the Cosmetics Directive**. 2003. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/\(2\)_executive_summary_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/(2)_executive_summary_en.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2013.
- EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. Publications. Alternatives to Animal Testing. Serious about Cosmetics - Serious about Alternative Methods. Updated version, May 2007. **COLIPA: Serious about Cosmetics - Serious about Alternative Methods**. 2007. Disponível em: <<https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/alternatives-to-animal-testing.html?view=item&id=7>>. Acesso em: 03 abr. 2013.
- FANG, J.Y.; LEU, Y.L.; HWANG, T.L.; CHENG, H.C. Essential oils from sweet basil (*Ocimum basilicum*) as novel enhancers to accelerate transdermal drug delivery. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1819-1825, 2004.

- FARIAS, V.; ROCHA, L.D.; PREUSSLER, K.H.; MARANHO, L.T. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 398-406, 2009.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.
- FESTING, M.F.W. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments in papers submitted to *ATLA*. **ATLA**, v. 29, p. 427-446, 2001.
- FIELD, T.S.; BRODRIBB, T.; HOLBROOK, N.M. Hardly a relict: freezing and the evolution of vesselless wood in Winteraceae. **Evolution**, v. 56, n. 3, p. 464-478, 2002.
- Final Report on the Safety Assessment of Polysorbates 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, and 85. International Journal of Toxicology**, v. 3, p. 1-82, 1984.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 9, p. 239-247, 2000.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.
- FOURNET, A., ROJAS DE ARIAS, A., CHARLES, B., BRUNETON, J. Chemical constituents of essential oils of MUÑA, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 145-149, 1996.
- FRADE, R.F.M.; CANDEIAS, N.R.; DUARTE, C.M.M.; ANDRÉ, V.; DUARTE, M.T.; GOIS, P.M.P.; AFONSO, C.A.M. New dirhodium complex with activity towards colorectal cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3413-3415, 2010.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6.ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. 732 p.
- FUND FOR REPLACEMENT OF ANIMAL MEDICAL EXPERIMENTS. About FRAME. **The history of FRAME**. Disponível em: <http://www.frame.org.uk/page.php?pg_id=42>. Acesso em: 25 fev. 2013.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GRESSLER, E.; PIZO, M.A.; MORELLATO, L.P.C Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.
- GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológico, geográfico, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRS, 2007. p. 13-28.
- GUERRA, P.C.; MOLINA, I.Y.; YÁBAR, E.; GIANOLI, E. Oviposition deterrence of shoots and essential oils of *Minthostachys* spp. (Lamiaceae) against the potato tuber moth. **Journal of Applied Entomology**, v. 131, n. 2, p. 134-138, 2007.

- HAWLEY, T.S.; HAWLEY, R.G. **Flow cytometry protocols**. Totowa, New Jersey: Human Press Inc., 2004. ed. 2, 434p.
- HAYES, A.J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 535-543, 2002.
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, p. 585-620, 1961.
- HOLGUÍN, J.M. Cultivo ecológico de plantas medicinales y aromáticas: ampliando las perspectivas económicas en los Andes. **LEISA Revista de Agroecología**, v. 21, n. 2, p. 33-36, 2005. Disponível em: <http://www.agriculturesnetwork.org/magazines/latin-america/mas-que-el-dinero/cultivo-ecologico-de-plantas-medicinales-y/at_download/article_pdf>. Acesso em: 13 mar. 2013.
- IBARRA, F.; JOHNSON, C.H. Natural preservatives from concepts in nature. **Cosmetics & Toiletries**, v. 123, p. 3, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. **Ecosistemas brasileiros**: Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm>. Acesso em: 12 mar. 2013.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica; período 1995-2000**. São José do Rio Preto: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2002. Disponível em: <<http://mtc-m12.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/jeferson/2003/06.02.07.45/doc/RelatorioAtlas.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2013.
- INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. **Peer Review Panel Report**: the use of *in vitro* basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. Bethesda: National Institutes of Health, 2006. 62p. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/ATpanelrpt06/ATpanelrpt.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2013.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**: biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. Geneva: ISO, 2009. 34p.
- INVITROGEN. **Introduction to Flow Cytometry**. Disponível em: <http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html>. Acesso em: 17 abr. 2013.
- JAGANATHAN, S.K.; SUPRIYANTO, E. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. **Molecules**, v. 17, p. 6290-6304, 2012.
- JOHNSON, T.E.; UMBENHAUER, D.R.; GALLOWAY, S.M. Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 28, p. 51-59, 1996.
- KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDO VÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁŘOVÁ, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1298-1303, 2007.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; ELHAJOUJI, A.; CUNDARI, E.; HUMMELEN, P.V. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis,

- chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutation Research**, v. 392 p. 19-30, 1997.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE-JR., M.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; HUDE, W.V.D.; WAKATA, A. Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p.167-172, 2000.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.
- LACHMAN, L; LIERBERMAN, H. A; KANIG, J. L. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. ed. 3, p. 514-517.
- LAGO, J.H.; CARVALHO, L.A.C.; SILVA, F.S.; TOYAMA, D.O.; FÁVERO, O.A.; ROMOFF, P. Oils from leaves and stem barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1760-1765, 2010.
- LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v.18, p. 435-448, 2004.
- LANDRUM, L.R. **Flora Neotropica: Campomanesia, pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma** (Myrtaceae). New York: New York Botanical Garden Press, 1986. Monograph, v. 45.
- LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LEE, C.J.; CHEN, L.G.; CHANG, T.L.; KE, W.M.; LO, Y.F.; WANG, C.C. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**, v. 124, p. 833-841, 2011.
- LEE, M.C.S.; MILLER, E.A.; GOLDBERG, J.; ORCI, L.; SCHEKMAN, R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. **Annual Review of Cell Biology**, v. 20, p. 87-123, 2004.
- LIMA, M.E.L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; SOBRA, M.E.G.; MORENO, P.R.H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 589-593, 2006.
- LIMBERGER, R.P.; SCOPEL, M.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 130-137, 2007.
- LIMBERGER, R.R.; HENRIQUES, A.I.; APEL, M.A.; LIMA, M.E.L.; MORENO, P.R.H.; CORDEIRO, I. Essential oil from leaves and stem bark of southeastern *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 6, p. 504-506, 2008.
- LIN, S.; LIN, D.C.; FLANAGAN, M.D. Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes. **Cell Biology**, v. 75, n. 1, p. 329-333, 1978.

- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Biologia molecular e celular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 1084 p.
- LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Assessment of Pharmaceutical Equivalence: Difference Test or Equivalence Test? **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 4, p. 597-604, 2012.
- MAHMOUD, U.M.; MEKKAWY, I.A.A.; SAYED, A.E.D.H. Ultraviolet radiation-A (366 nm) induced morphological and histological malformations during embryogenesis of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 95, p. 117-128, 2009.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; SCHMITT, C.B.; YUNES, R.A.; ESCALANTE, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; MONACHE, F.D. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 335-339, 2005.
- MARGOLIN, B.H.; RESNICK, M.A.; RIMPO, J.Y.; ARCHER, P.; GALLOWAY, S.M.; BLOOM, A.D.; ZEIGER, E. Statistical Analyses for In Vitro Cytogenetic Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. **Environmental Mutagenesis**, v. 8, p. 183-204, 1986.
- MARIOT, A. **Fundamentos para o manejo de populações naturais de *Drimys brasiliensis* Miers – Winteraceae**. Florianópolis, 2008. 129 p. Tese de Doutorado – Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais - Universidade de Santa Catarina.
- MARSDEN, P.A.; BALLERMANN, B.J. Tumor necrosis factor α activates soluble guanylate cyclase in bovine glomerular mesangial cells via an L-arginine-dependent mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 1843-1852, 1990.
- MARTINS, A.K.A. Técnicas básicas em cultura de células. In: MALDONADO, C.P.; CURI, R., coords. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 10-12.
- MARTINS, A.K.A.; BOAVENTURA, M.F.C.; LIMA, M.M.R. Cultivo de linhagens permanentes. In: MALDONADO, C.P.; CURI, R., coords. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 41-49.
- MARTINS, M.S.; RÓZ, A.L.; MACHADO, G.O. **Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://educar.sc.usp.br/licenciatura/trabalhos/mataatl.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2013.
- MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J.M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.
- MASTERS, J.R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews - Cancer**, v. 2, p. 315-319, 2002.
- MATTS, P.J. Solar ultraviolet radiation: definitions and terminology. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 1-8, 2006.
- MELLO-SILVA, R. **Winteraceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15323>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

- MERCK. **Tween® 20 (polissorbato) - Informações sobre o produto.** Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/brazil/chemicals/tween-20-polissorbato/MDA_CHEM-8170721000/p_uuid>. Acesso em: 11 abr. 2013.
- MORA, F.D.; ARAQUE, M.; ROJAS, L.B.; RAMIREZ, R.; SILVA, B.; USUBILLAGA, A. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 7, p.997-1000, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUTH, J.E.D. **Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Application**. 2 ed. New York, NY: Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, 2006. 714p.
- NATHALIE, D.; YANNICK, G.; CAROLINE, B.; SANDRINE, D.; CLAUDE, F.; CORINNE, C.; PIERRE-JACQUES, F. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. **Toxicology In Vitro**, v. 20, p. 480-489, 2006.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity**, NIH Publication n. 01-4500, ago. 2001. Disponível em: < http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2013.
- NICHOLAS, J.S. **Ross Granville Harrison: 1870-1959: a biographical memoir**. Washington: National Academy of Sciences, 1961. p. 130-162 Disponível em: <<http://www.nasonline.org/publications/biographical-memoirs/memoir-pdfs/harrison-ross.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2013.
- NON-ANIMAL METHODS FOR TOXICITY TESTING. **Toxicity Testing Resource Center. Validation, Regulatory Acceptance & International Harmonization**. Table of Validated and Accepted Alternative Methods. fev. 2013. Disponível em: <<http://alttox.org/ttrc/validation-ra/validated-ra-methods.html>>. Acesso em: 04 abr. 2013.
- NOVA, P.C.C.V.; ARRUDA, E.J.; OLIVEIRA, L.C.S. Análises de cumarina, psoraleno e bergapteno em derivados de *Citrus* utilizando HRGC-PID, HRGC-FID e HRGC-MS. **BioFar Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, n. 1, p. 10-17, 2012.
- NÜSSE, M.; MARX, K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. **Mutation Research**, v. 392, p. 109-115, 1997.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Histologia vegetal. In:_____. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 49-81. (Biblioteca Biomédica).
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Principles of good laboratory practice**: (as revised in 1997). Paris: OECD, 1998. (OECD Environmental Health and Safety Publications. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance monitoring, n.1 - ENV/MC/CHEM(98)17). Disponível em: <[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&doclanguage=en)>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- _____. **Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment Number 34**. Paris: Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2005. 96 p. (OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and

assessment, n.34 - ENV/JM/MONO (2005)14). [Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology]. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-GD34.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

_____. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, No. 129.** Paris: OECD, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n. 129 - ENV/JM/MONO (2010) 20). Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-GD129.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

_____. Guideline for Testing of Chemicals. **Guidance Document 101: "UV-VIS Absorption Spectra" (Spectrophotometric Method)**, 1981. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9710101e.pdf?expires=1366473476&id=id&accname=guest&checksum=32B1B4E57C32844DA1FC205BCE51DA71>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

_____. List of OECD Member countries - Ratification of the Convention on the OECD. Disponível em: <<http://www.oecd.org/general/listofocdmembercountries-ratificationoftheconventionontheoecd.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

_____. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Test No. 487: *in vitro* Mammalian Cell Micronucleus test (MNvit)**, 2010. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9748701e.pdf?expires=1366471876&id=id&accname=guest&checksum=7BD6F0DF313C48D36907E9E8E540CCCC>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

_____. OECDiLibrary. Books. Book Series. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects.** Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788>. Acesso em: 04 abr. 2013a.

_____. **Testing of chemicals, section 4, health effects, draft test guidelines.** Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4healtheffects.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2013b.

_____. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Test No. 432: *In vitro* e 3T3 NRU phototoxicity test**, 2004. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9743201e.pdf?expires=1366471631&id=id&accname=guest&checksum=2BC5CA594520BEDB30F74D36C93046E5>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

PALM, M.D.; O'DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 360-376, 2007.

PARRY, J.M.; SORS, A. The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. **Mutation Research**, v. 287, p. 3-15, 1993.

PAULA, J.A.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R.Landrum-Mystaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PAULA, J.A.M.; REIS, J.B.; FERREIRA, L.H.M.; MENEZES, A.C.S.; PAULA, J.R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 363-379, 2010.

PEIXOTO, G.L.; MARTINS, S.V.; SILVA, A.F.; SILVA, E. Composição florística do componente arbóreo de um trecho de Floresta Atlântica na área de proteção ambiental da Serra da Capoeira Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 151-160, 2004.

- PHOTOTOX[®]. Statistical Software Phototox[®] Version 2.0 for OECD Test Guideline 432. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/33968900.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2013.
- PINTO, D.M.L. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. São Paulo, 2010. 65 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Ensaios toxicológicos de inocuidade. In: _____. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 697-772.
- PRIMO, V.; ROVERA, M.; ZANON, S.; OLIVA, M.; DEMO, M.; DAGHERO, J.; SABINI, L. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 33, n. 2, p. 113-117, 2001.
- PROMEGA[®]. **Technical Bulletin: Cell titer 96[®] AQueous non-radioactive cell proliferation assay**. Revisado dez. 2012. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20Non-Radioactive%20Cell%20Proliferation%20systems%20protocol.pdf>>. Acesso em 24 abr. 2013.
- PUCK, T.T.; CIECIURA, S.J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long term cultivation of euploid cells from and animal subjects. **Journal of Experimental Medicine**, v. 108, p. 945-956, 1958.
- RAHMAN, M. Introduction for flow cytometry. AbD Serotec – A division of MorphoSys. Disponível em: <<http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2013.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Introdução à angiospermas. In: _____. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 477-496.
- REDE NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS. **Métodos alternativos**. Disponível em: <<http://renama.org.br/2012/09/metodos-alternativos/>>. Acesso em: 16 jan. 2013.
- RIBEIRO, V.L.; ROLIM, V.; BORDIGNON, S.; HENRIQUES, A.T.; DORNELES, G.G.; LIMBERGER, R.; VON POSER, G. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 102, p. 531-535, 2008.
- RISTOW, M.; ZARSE, K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 410-418, 2010.
- RODAS, A.C.D.; LOPES, P.S.; HIGA, O.Z. Genotoxicity by Micronucleus Assay for Medical Devices Development. In: KOCSIS, A.; MOLNAR, H. **Genotoxicity evaluation, testing, and prediction**. New York, NY: Nova Science Publisher, Inc. p. 111-126.
- RODAS, A.C.D.; MAIZATO, M.J.S.; LEIRNER, A.A.; PITOMBO, R.N.M.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; HIGA, O.Z. Cytotoxicity and genotoxicity of bovine pericardium preserved in glycerol. **Artificial Organs**, v. 32, p. 272-276, 2008.
- ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. 3 ed., 444p.

- ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; DANTAS-NETO, A.A.; MACIEL, M.A.M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.
- _____. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, 2007.
- RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. An abridge version of: the principles of humane experimental technique. In: BALLS, M. **The three Rs and the humanity criterion**: reduction, refinement, replacement. Nottingham: FRAME, 2009. p. 1-111.
- SADIKOVIC, B.; RODENHISER, D.I. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, p. 458-468, 2006.
- SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003. p. 201-219.
- SANTOS, F.R.A. **Emulsões múltiplas: formulações, caracterização, estabilidade e aplicações**. 2011. 68 p. Monografia de Mestrado - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa.
- SARTORI, P.H.S.; LORETO, E.L.S. Medidor de fluorescência caseiro. *Química Nova na Escola*, v. 31, n.2, p. 150-154, 2009.
- SAUER, H.; WEFER, K.; VETRUGNO, V.; POCCHIARI, M.; GISSEL, C.; SACHINIDIS, A.; HESCHELER, J.U.; WARTENBERG, M. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- α : the role of intracellular reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 6, p. 586-594, 2003.
- SCHEFFOLD, A.; KERN, F. Recent Developments in Flow Cytometry. **Journal of Clinical Immunology**, v. 20, n. 6, p. 400-407, 2000.
- SCHMIDT-LEBUHN, A.N. Monophyly and phylogenetic relationships of *Minthostachys* (Labiatae, Nepetoideae) examined using morphological and nrITS data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 270, p. 25-38, 2008.
- SCHWAB, W.; FUCHS, C.; HUANG, F.C. Transformation of terpenes into fine chemicals. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, p. 3-8, 2013.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. **The SCCS'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation**: 7th revision. (SCCS Notes of Guidance, 7th revision, SCCS/1416/11). [The SCCS adopted this opinion at its 9th plenary meeting of 14 December 2010]. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_004.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2013.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, P.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.
- SEITÉ, S.; MOYAL, D.; VERDIER, M.-P.; HOURSEAU, C.; FOURTANIER, A. Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 16, p. 3-9, 2000.

SENATORE, F. Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epl. (Lamiaceae) from Peru. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 263-265, 1998.

SIGMA-ALDRICH. **Neutral red**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/n7005?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 23 jan. 2013a.

SIGMA-ALDRICH®. **Production information, Triton X-100**. Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/x100pis.Par.0001.File.tmp/x100pis.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2013b.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRS, 2007. p. 467-495.

SIMONI, I.C. **Casca d'anta: espécie com potencial medicinal**. In: INSTITUTO BIOLÓGICO.

Publicações. Comunicados técnicos. 2011. Disponível em:

<http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=158>. Acesso em: 01 abr. 2013.

SIVROPOULOU, A.; NIKOLAOU, C.; PAPANIKOLAOU, E.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3197-320, 1997.

SKLOOT, R. **A vida imortal de Henrietta Lacks**. São Paulo: Companhia das Letras, 2011. 454 p.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil**, 2010. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10823>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

SORCE, C.; LORENZI, R.; RANALLI, P. The effects of (S)-(+)-carvone treatments on seed potato tuber dormancy and sprouting. **Potato Research**, v. 40, p. 155-161, 1997.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W.J.W.; PECHOVITCH, G.; SILVA, O.; HOLZHÜTTER, H.G.; CLOTHIER, R.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W.W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J.M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The international EU/COLIPA phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicology In Vitro**, v. 12, p. 305-327, 1998.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 150, n. 1, p. 25-38, 2006.

TAYLOR, F.A.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Tradução: ROTHSCCHILD, Z.; ROTHSCCHILD, A.M. *et al.* São Paulo, SP: Editora Universidade de São Paulo, 2003. 3 ed., 732p.

TODARO, G.J.; AARONSON, S.A. Properties of clonal lines of murine sarcoma virus transformed Balb-3T3 cells. **Virology**, v. 38, n. 1, p.174-179, 1969.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA. Department of Pharmaceutical Chemistry. ZINC Database. **Linolool**. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/synonym/linolool>>. Acesso em: 18 mar. 2013a.

- _____. Department of Pharmaceutical Chemistry. ZINC Database. **Pulegone**. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/substance/5735752>>. Acesso em: 18 mar. 2013b.
- _____. Department of Pharmaceutical Chemistry. ZINC Database. **Alpha-pinene**. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/synonym/alpha-pinene>>. Acesso em: 18 mar. 2013c.
- _____. Department of Pharmaceutical Chemistry. ZINC Database. **Eugenol**. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/synonym/Eugenol>>. Acesso em: 18 mar. 2013d.
- _____. Department of Pharmaceutical Chemistry. ZINC Database. **Bergaptene**. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/synonym/bergaptene>>. Acesso em: 18 mar. 2013e.
- UNLU, M.; ERGENE, E.; UNLU, G.V.; ZEYTINOGLU, H.S.; VURAL, N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3274-3280, 2010.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VILLA, C.; TRUCCHI, B.; BERTOLI, A.; PISTELLI, L.; PARODI, A.; BASSI, A.M.; FUFFONI, B. *Salvia somalensis* essential oil as a potential cosmetic ingredient: solvent-free microwave extraction, hydrodistillation, GC-MS analysis, odour evaluation and *in vitro* cytotoxicity assays. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 55-61, 2009.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos da Bioquímica: a vida em nível molecular**. Tradução: RODRIGUES, J.J.S.; SOUZA, L.F.; BASTIANI, M.; FARIAS, S.E. Porto Alegre, RS: Artmed, 2006. ed. 2, 1264 p.
- VUKOTIC, M.; OELJEKLAUS, S.; WIESE, S.; VÖGTLE, F.N.; MEISINGER, C.; MEYER, H.E.; ZIESENISS, A.; KATSCHINSKI, D.M.; JANS, D.C.; JAKOBS, S.; WARSCHIED, B.; REHLING, P.; DECKERS, M. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 336-347, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Health and environmental effects of ultraviolet radiation**: A scientific summary of environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation (WHO/EHG/95.16). Geneva: WHO, 1994. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/publications/UVEffectEffects.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2013.
- ZHANG, Y.; ZHAO, B. Green tea polyphenols enhance sodium nitroprusside-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, p. 1189-1200, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/SM)

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada no Instituto de Botânica pelo grupo do Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch, IQ-USP.

O cromatógrafo utilizado foi o a gás com detector de ionização de chamas (CG-DIC) em um cromatógrafo (Varian[®], modelo CP 3380), com coluna DB-5 (30 m x 25 µm x 0,25 µm). Para a análise foram realizadas diluição das amostras dos óleos essenciais em acetona (MERCK[®], número CAS 67-64-1) na razão de 1:100 (v/v). Em seguida, alíquotas de 1 µL dessas amostras diluídas foram injetadas no cromatógrafo a gás que, quantificou os componentes identificados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um cromatógrafo (Agilent[®], série 6890) acoplado a um espectrômetro de massas com sistema quadrupolo (Agilent[®] 5973, *Network Mass Selective Detector*) em uma coluna HP-5MS (30 m x 25 µm x 0,25 µm), de acordo com metodologia descrita na literatura (ADAMS, 2007).

O injetor (com divisão de fluxo - *split/splitless*) foi programado para 250 °C (razão de divisão 1:20) com temperatura inicial de 40 °C e final de 240 °C com aumento de 3 °C/minutos, e o tempo total de análise foi de 80 minutos. O gás de arraste utilizado foi hélio, com uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL por minuto. Os gases auxiliares utilizados foram nitrogênio, ar sintético e hidrogênio, na razão de 1:1:10, respectivamente.

A identificação dos componentes do óleo foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas com amostras autênticas e dados retirados da literatura (ADAMS, 2007) e também por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados (Wiley 275). A composição é apresentada nos ANEXOS B, C, D, E e F.

ANEXO B - Composição química do óleo essencial da *Minthostachys setosa* (Briq.). Fonte: PINTO, 2010

Componente	%
α -tujeno	0,4
α -pineno	1,2
sabineno	1,3
mirceno	1,0
octan-3-ol	1,1
α -terpineno	0,3
orto-cimeno	2,6
limoneno	1,9
(z)- β -ocimeno	0,2
(e)- β -ocimeno	1,6
γ -terpineno	1,2
linalol	4,0
acetato de 3-octila	0,6
mentona	12,6
iso-mentona	11,0
iso-pulegona	5,8
α -terpineol	0,3
decan-3-ol	0,2
pulegona	28,6
piperitona	0,6
timol	0,5
carvacrol	2,6
acetato de cis-piperitila	0,2
δ -elemeno	2,1
piperitona	0,7
acetato de timila	0,6
acetato de carvacrila	5,6
β -bourboneno	0,3
β -elemeno	0,3
e-cariofileno	4,0
β -copaeno	3,0
α -humuleno	0,6
alo-aromadendreno	0,2
6-desmetoxi-ageratocromeno	0,2
germacreno d	2,0
biciclogermacreno	2,5
espatulenol	0,5
oxido de cariofileno	0,2
2s,5e-cariofil-5-en-12-al	0,2

ANEXO C - Composição química do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes)

Landrum quimiotipo Cananéia

Componente	%
eugenol	31,5
z-isoeugenol	14,8
metil-eugenol	12,2
1,8-cineol	9,3
para-cimeno	5,8
terpinoleno	5,6
α -pineno	4,0
α -felandreno	3,6
sabineno	2,9
γ -terpineno	2,4
δ -3-careno	1,9
α -tujeno	1,8
trans- β -terpineol	1,1
α -(e,e)-farneseno	1,0
α -terpinoleno	0,8
β -pineno	0,7
(e)- β -ocimeno	0,7

ANEXO D - Composição química do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes)

Landrum quimiotipo Cataia

Componente	%
para-cimeno	18,9
eugenol	17,9
terpinoleno	14,0
α -terpineno	13,8
mirceno	9,0
e- β -ocimeno	6,7
α -felandreno	4,2
α -tujeno	4,0
α -pineno	3,3
1,8-cineol	2,4
trans- β -terpineol	2,4
δ -3-careno	1,7
β -pineno	1,1
α -terpineol	0,8

ANEXO E - Composição química do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes)

Landrum quimiotipo Morro Grande

Componente	%
eugenol	19,6
1,8-cineol	14,0
citronelol	9,7
β -pineno	9,5
espatulenol	9,4
metil-eugenol	9,2
α -pineno	4,8
citronelal	3,8
geranial	2,7
cis-carveol	2,3
epóxido de humuleno ii	2,2
β -cariofileno	2,2
α -muurolol	2,1
cis- β -guaíeno	1,7
muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1,6
neo-isopulegol	1,0
α -humuleno	0,9
α -terpineol	0,8
γ -muuroleno	0,8
β -elemeno	0,7
(e)- β -ocimeno	0,7
óxido de cariofileno	0,6

ANEXO F - Composição química do óleo essencial da *Drimys brasiliensis* Miers

Componente	%
α -pineno	23,4
sabineno	9,3
mirceno	1,5
α -terpineno	1,8
limoneno	4,0
4-terpinenol	3,5
germacreno d	2,4
biciclogermacreno	1,2
nerolidol	2,9
espatulenol	2,4
globulol	1,1
viridiflorol	1,2
guaiol	1,0
α -cadinol	2,7
drimenol	1,9
ciccolorenona	21,0