

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Estudo químico, biológico e toxicológico de *Drimys angustifolia* Miers e *Drimys
brasiliensis* Miers

MADSON RALIDE FONSECA GOMES

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo químico, biológico e toxicológico de *Drimys angustifolia* Miers e *Drimys brasiliensis* Miers

Tese apresentada por Madson Ralide Fonseca Gomes para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de agosto de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dr. Fabiane Moreira Farias
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Profa. Dr. Maria Martha Campos
Pontifícia Universidade Católica – PUCRS

Profa. Dr. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger – Orientadora
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Gomes, Madson Ralide Fonseca
Estudo químico, biológico e toxicológico de *Drimys angustifolia* Miers e *Drimys brasiliensis* Miers /
Madson Ralide Fonseca Gomes. -- 2012.
76 f.

Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Óleos essenciais. 2. Atividade biológica. 3. Toxicidade in vitro. 4. Toxicidade in vivo. 5. *Drimys*. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Miguel e Lúcia, e a toda minha família que torceram pelo meu sucesso e embarcaram juntamente comigo nos meus sonhos... Muito obrigado de coração!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me permitir em todos estes anos aprender mais para que eu possa ajudar as pessoas com os conhecimentos que adquiri.

Aos meus pais Miguel e Lúcia, por terem acreditado nos meus sonhos e me auxiliado de todas as maneiras, me amparando, me dando forças e me fazendo acreditar que, com a família unida, tudo fica mais fácil. Amo vocês meus lindos...

Aos meus irmãos Patrick e Marden, pelo incentivo e conversas que muitas vezes me fizeram companhia quando eu estava só e tão longe de casa.

Aos meus sobrinhos Amanda e Lucas, por serem uns fofos e que cada sorriso de vocês me fazia muito bem, mesmo quando o Lucas não queria falar comigo ao telefone.

Aos meus familiares, pelo apoio e todo carinho, principalmente nas minhas idas à Belém.

À minha orientadora, Professora Doutora Renata Pereira Limberguer, por ter me acolhido num momento tão delicado e difícil da minha vida e, em especial, pela paciência e ensinamentos.

À professora Doutora Lúcia Vargas da Universidade de Caxias do Sul, por sempre ter sido tão gentil e acreditado no trabalho.

Às professoras, Doutora Maria Martha Campos e Doutora Fernanda B. Morrone da Pontifícia Universidade Católica – PUCRS, pela paciência e empenho, cedendo os laboratórios e pessoal para me auxiliar nos experimentos.

Ao professor Doutor Pedro Froehlich pela forma que conduziu minha transição de projeto e mudança de orientação, meu muito obrigado.

À Professora Doutora Gilsane Lino von Poser pela sensibilidade e por ter me ajudado a encontrar uma nova orientadora.

À Professora Doutora Onilda Santos da Silva, pela disponibilidade e ensinamentos.

Ao professor Doutor Jarbas Montanha, pela dedicação e ensinamentos.

À Professora Doutora Eliane Dallegrove, pela disposição e entusiasmo na condução dos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia (Gabits, Krisinha, Paulits, Mairits, Elosits, Otávio, Debits, Rachel, Juliana, Fernando, Rose, Ana Laura, Gilcéia,

Ortiz, Adriana) meu muito obrigado por me receberem tão bem e termos passado tantos momentos divertidos e partilhado de conhecimentos e experiências, vou levar vocês em meu coração.

À doce Krisinha, que com seus abraços apertados quando eu chegava ao laboratório me faziam não me sentir tão só por estar tão longe de casa.

Às minhas queridas e amadas Rose e Ana Laura, não sei o que seria de mim sem vocês... Muito obrigado mesmo... e é claro, ao TRENSURB.

À Daiane e Regina, por terem acreditado nas minhas hipóteses para não chamar de loucuras, e terem sido tão profissionais.

À minha querida e especial Gabits, pelos puxões de orelha e amizade. Nunca vou te esquecer.

À minha querida Yatsusinha, pela amizade, convivência e longas conversas nos corredores.

À doutoranda da PUCRS, Marina Gehring pela ajuda e paciência nos ensaios antitumorais. Você é nota dez.

À FIOCRUZ pela doação das cepas dos fungos *Acremonium*.

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (Regina, Daiane, Pedro, Samuel (Antártica), Cristiane, Julianas, Simone, Cabral, Francine, Prof. Ortega, Débora), que sempre me receberam muito bem... Afinal, era o meu segundo laboratório.

Aos meus amigos Tiago Claudino, Mônica, Natinha, Rômulo, Ana Cristina, Sidoca, Douglas, Danilo, Bruno e todos os outros que fiz nestes quatro anos de doutorado, pelas conversas e por dividir um pouco de suas vidas comigo.

À todos que torceram por mim e me incentivaram a não desistir.

Só sei que nada sei.

Sócrates

RESUMO

O gênero *Drimys* é o de maior área de distribuição geográfica da família (Winteraceae), que compreende sete gêneros e cerca de 120 espécies. No Brasil, encontra-se desde a Bahia até o Rio Grande do Sul e ocorre em duas espécies, *Drimys angustifolia* Miers. e *Drimys brasiliensis* Miers, conhecidas popularmente como “casca-de-anta”. As folhas e cascas são usadas na medicina popular como antiescorbútico, estimulante, antiespasmódica, antidiarreica, antifebril, contra hemorragia uterina, antibacteriana, no tratamento de asma, bronquite, certas afecções do trato digestivo e, algumas vezes no tratamento do câncer e inseticidas. Ambas são caracterizadas pela presença de flavonóides e sesquiterpenoides. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a composição química, o potencial antioxidante, antiviral, inseticida, antitumoral, antifúngico, avaliação tóxica aguda e, também, formular e caracterizar duas nanoemulsões dos óleos voláteis das duas espécies do estudo. Por meio da hidrodestilação, foi possível realizar a extração dos óleos essenciais e determinar seus rendimentos que variaram entre 0,3 e 0,5% de folhas. A identificação dos componentes foi realizada utilizando a Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (CG-EM), as quais apresentaram como componentes majoritários em todas as análises, o biciclogermacreno para a espécie *Drimys angustifolia* e a ciclocoloronona para a espécie *Drimys brasiliensis*. A formulação e caracterização da nanoemulsão foi realizada dentro dos parâmetros estabelecidos (tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH) e através da microscopia eletrônica de transmissão foi confirmado o tamanho na escala nano. No que tange a atividade inseticida, ambas as espécies mostraram-se promissoras repelindo o cupim da espécie *Cryptotermes brevis* com índices de repelência negativos. Para avaliação inicial do potencial larvicida de *Aedes aegypti*, os óleos das duas espécies não foram eficientes. No entanto, a nanoemulsão de *Drimys brasiliensis* levou a 69% e 89% de mortalidade, correspondendo às concentrações de 0,5 µg/mL e 0,83 µg/mL, respectivamente. Com relação a atividade antioxidante, os óleos das duas espécies não foram capazes de reduzir o radical (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) DPPH . Já na atividade antiviral frente ao VHS-1, as duas espécies mostraram-se promissoras inibindo a replicação viral. Na atividade antitumoral nas linhagens de glioma (U-138 MG) e de bexiga (T24), somente o óleo de *Drimys brasiliensis* reduziu a viabilidade celular das duas linhagens pelo ensaio do MTT,

com resultados similares na contagem celular. Na análise da citometria pela incorporação da Anexina-V/Iodeto de propídio caracterizou-se indução de apoptose tardia. Na atividade antifúngica, as duas espécies foram eficazes contra o fungo oportunista *Acremonium*, presente em diversas infecções em transplantados e imunocomprometidos. Quanto à avaliação da toxicidade aguda, as duas espécies mostraram importantes sinais de toxicidade em ratos Wistar como ptose, tremor, redução da atividade motora, exolftamia, aumento da frequência respiratória. Os animais tratados com espécie *D. brasiliensis* ainda apresentaram aumento na micção e diarréia. Desta maneira, é importante ressaltar que todos os ensaios biológicos, o estudo toxicológico, e a elaboração e caracterização das nanoemulsões dos óleos essenciais foram realizados pela primeira vez para as duas espécies vegetais, destacando a importância e ineditismo do presente trabalho.

Palavras-chave: *Drimys*. Óleos essenciais. Atividade biológica. Toxicidade *in vitro*. Toxicidade *in vivo*.

ABSTRACT

The genus *Drimys* presents the largest geographical distribution of the family (Winteraceae), which comprises seven genera and about 120 species. In Brazil, is found from Bahia to Rio Grande do Sul and occurs in two species, *Drimys angustifolia* L. and *Drimys brasiliensis* Miers, popularly known as "Casca-de-anta". The leaves and barks are used in folk medicine as antiscorbutic, stimulant, antispasmodic, anti-diarrheal, antipyretic, against uterine bleeding, antibacterial, to treat asthma, bronchitis, certain disorders of the digestive tract and sometimes in the treatment of cancer and insecticides. Both are characterized by the presence of flavonoids and sesquiterpenoids. The objective of this study was to evaluate the chemical composition, the antioxidant, antiviral, insecticidal, antitumor, antifungal, acute toxicological evaluation and also to formulate and characterize two nanoemulsions of the volatile oils of two species of the study. By steam distillation was possible to perform the extraction of essential oils and to determine their yields ranging between 0.3 and 0.5% of leaves. The identification of components was performed using the Gas Chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS), which presented as major components in all analysis bicyclogermacrene for the *Drimys angustifolia* species and ciccolorenona for the *Drimys brasiliensis*. The formulation and characterization of nanoemulsion was performed within the established parameters (particle size, polydispersity, pH) and by transmission electron microscopy confirming the size at the nanoscale. Regarding the insecticidal activity, both species were promising repelling termites *Cryptotermes brevis* with negative index of repellency. To evaluate initial potential larvicidal *Aedes aegypti*, the oils of the two species were not efficient, however, of the *Drimys brasiliensis* nanoemulsion the larvae mortality of the 69% and 89%, corresponding to concentrations of 0.5 µg/mL and 0.83 µg/mL, respectively. With respect to antioxidant activity, the oils of the two species have not been able to reduce the (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH radical. In the antiviral activity against the HSV-1, the two species were promising inhibiting viral replication. In antitumor activity in glioma cell lines (U-138 MG) and bladder (T24), only the oil *Drimys brasiliensis* reduced cell viability of two strains by the MTT assay, with similar results in cell counts and flow cytometry analysis of the incorporation of Annexin-V/Propidium Iodide characterized as late apoptosis. In the antifungal activity, the two species were effective against the

opportunistic fungus *Acremonium*, present in various infections in transplant and immunocompromised. Regarding the evaluation of acute toxicity, the two species showed significant signs of toxicity in rats as ptosis, tremor, decreased motor activity, exoftalmia, shortness of breath. Animals treated with species *Drimys brasiliensis* also showed an increase in urination and diarrhea. Thus, it is important that all biological assays, the toxicity study, and preparation and characterization of nanoemulsions of essential oils were first performed for the two species, highlighting the importance and originality of this work.

Keywords: *Drimys*. Essential oils. Biological activity. *in vitro* toxicity. *in vivo* toxicity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Analysis of Variance
CG/EM	Cromatografia Gasosa/Espectrofotômetro de Massas
CPE	Cytopathic Effects
DA	<i>Drimys angustifolia</i>
DB	<i>Drimys brasiliensis</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPA	Environmental Protection Agency
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FEEPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
LC ₅₀	Lethal Concentration
LD ₅₀	Lethal Dose
MTC	Maximum Tolerated Concentration
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffer Saline
TCID	Tissue Culture Infection Doses
VHS	Virus Herpes Simples

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido, sob a orientação da Profa. Dr. Renata Pereira Limberger, nos laboratórios de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia, e Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Os ensaios antivirais foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Jarbas Montanha. As nanoemulsões foram formuladas no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia sob a orientação da Profa. Dr. Letícia Koester. Os ensaios antifúngicos foram realizados no Laboratório de Micologia sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria. Os ensaios com as larvas do mosquito da dengue foram realizados no laboratório de Parasitologia com a supervisão da Profa. Dr. Onilda Santos da Silva. Todos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os ensaios de atividade inseticida em cupins foram realizados em parceria com o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, sob a orientação da Profa. Dr. Lúcia Rosane Vargas. A avaliação da atividade antitumoral foi realizada no Laboratório de Cultura Celular da Pontifícia Universidade Católica – PUCRS, sob a orientação da Prof^a Dr. Maria Martha Campos e da Pesquisadora Fernanda B. Morrone.

A pesquisa teve o apoio do CNPq.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	22
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	29
3.2 <i>DRIMYS ANGUSTIFOLIA</i> E <i>DRIMYS BRASILIENSIS</i>	30
3.3 NANOEMULSÕES	31
3.4 ATIVIDADE INSETICIDA	31
3.4.1 Cupins	33
3.4.2 <i>Aedes aegypti</i>	33
3.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL	34
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
3.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	35
3.8 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	36
3.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	37
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A – REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS BÁSICA E APLICADA (ACEITE PARA PUBLICAÇÃO).....	66
ANEXO B – RFAR-1629 (ACEITE PARA PUBLICAÇÃO).....	68
ANEXO C – RFAR-1540 (ACEITE PARA PUBLICAÇÃO).....	70
ANEXO D – COMITÊ DE ÉTICA DA FEPPS (AVALIAÇÃO)	73

PARTE I

APRESENTAÇÃO

OBJETIVOS

REVISÃO

1 APRESENTAÇÃO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades ou cura das mais diversas doenças é tão antiga quanto a espécie humana. Os conhecimentos de plantas representam muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, o mundo mantém grande aceitação ao consumo de fitoterápicos, buscando conhecimentos e informações que foram sendo acumulados durante séculos (MACIEL et al., 2002). Pode-se considerar como planta medicinal aquela administrada sob qualquer forma ou parte dela e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica. Suas aplicações são amplas abrangendo desde o combate ao câncer até microorganismos patogênicos (CALIXTO, 2000; SILVA, 2004).

A ANVISA, através da Resolução nº 10 de 09 de março de 2010, elencou uma série de medidas para assegurar o uso de plantas por parte da população. Estes documentos levam em consideração, dados etnofarmacológicos e estudos realizados com estas plantas, oferecendo maior segurança para a população no que se refere ao modo de uso, bem como, sua eficácia.

Abordaremos neste estudo, a composição química, as atividades inseticida, antiviral, antioxidante, antitumoral e antifúngica das espécies vegetais *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis* e os estudos toxicológicos *in vivo* utilizando ratos Wistar. Além disso, também foram elaboradas nanoemulsões das duas espécies, as quais foram caracterizadas e avaliadas sob o ponto de vista biológico nas atividades inseticida, antitumoral e antifúngica. As duas espécies do presente estudo possuem óleos essenciais em sua composição química, o que justifica os bioensaios que foram realizados, uma vez que, as atividades inseticida, antiviral, antioxidante, antitumoral e antifúngica são atribuídas a espécies vegetais que possuem estes óleos (YUNES, 2007).

Com relação à atividade inseticida, temos problemas relacionados a infestações por cupins, sendo a grande maioria das espécies endêmicas, principalmente na região neotropical. Esses insetos são essencialmente xilófagos e nas áreas urbanas mundiais, estima-se que os gastos com tratamento, reparo e substituições de peças atacadas por cupins alcancem, na atualidade, valores na

ordem de US\$ 5 a 10 bilhões anuais (FONTES; BERTI-FILHO, 1998; IBRAHIM; ADEBOTE, 2012). O patrimônio histórico e artístico cultural também é comumente atacado por cupins, onde a ação destes insetos abrange desde retábulos, altares, imagens e outras peças de madeira, sendo muitas vezes percebida somente quando os danos são de grande extensão, comprometendo, muitas vezes, a própria estabilidade estrutural da edificação (LOSS, 2008).

Outro ponto importante e caso de saúde pública são os casos de dengue em nosso país, com cerca de 764.032 casos registrados em 2011, com 191 mortes. A doença é transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* e tem como agente etiológico o vírus de RNA do gênero Flavivírus. A principal forma de controle dos casos de dengue é evitar que o ciclo biológico do mosquito se conclua. Para isso, o ataque às formas larvais que vivem em água parada é de fundamental importância (BRASIL, 2011).

Com os óleos essenciais das duas espécies foram realizados estudos de repelência e toxicidade frente à espécie *Cryptotermes brevis*, conhecida como cupim de madeira seca e a avaliação do potencial tóxico frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Para esta última, o potencial larvicida também foi avaliado com as nanoemulsões formuladas com os óleos das duas espécies.

No que se refere às infecções virais, o Herpes vírus humano (VHS-1) como principal causador de herpes labial e com o arsenal terapêutico restrito ao uso de aciclovir, estudos e investimentos na descoberta de novos agentes antivirais são de suma importância (FONSECA, 1999). Foi realizado um *screening* a fim de verificar o potencial antiviral em relação ao herpes vírus das espécies vegetais do estudo.

Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo quanto a própria espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente. Observa-se nas últimas décadas um enorme crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extratos brutos, de frações purificadas ou de componentes isolados (DESMARCHELIER et al., 1997; ZHENG; WANG, 2001; PAREJO et al., 2003; SILVA et al., 2005). As espécies foram avaliadas em seu potencial antioxidante utilizando o método da redução do radical DPPH.

Sobre a atividade antitumoral, aproximadamente 2% das mortes por câncer são atribuídas aos tumores cerebrais e sua complexa biologia e, ainda à capacidade das células deste tumor em invadir tecidos cerebrais adjacentes, muitas vezes de difícil acesso, o que dificulta a remoção dos mesmos. Isso leva à recidiva local e piora o prognóstico do paciente com glioma (STYLLI; KAYE, 2006). Em outros tipos de tumores, como o carcinoma humano de bexiga, a maioria dos pacientes pode apresentar tumores de bexiga superficiais, embora 20-40% dos tumores de bexiga evolua para uma forma invasiva (HINATA et al., 2003). Desta maneira, foi avaliado o potencial antitumoral *in vitro* frente às células de glioma humano e carcinoma humano de bexiga dos óleos voláteis e nanoemulsões das duas espécies vegetais.

Com relação à atividade antifúngica, a incidência e prevalência destas infecções invasivas têm aumentado desde a década de 80, especialmente na população de imunocomprometidos e/ou hospitalizados com doenças graves (ARENDRUP et al., 2005; ENOCH, 2006). Embora o arsenal das drogas antifúngicas tenha se expandido, estas não têm atendido a infecções em populações de pacientes complexos. O desenvolvimento de novas drogas antifúngicas tem sido necessário na terapia clínica (KATHIRAVAN et al., 2012). Neste contexto, foi avaliada a referida atividade com os óleos e nanoemulsões das duas espécies do estudo.

Em relação aos estudos toxicológicos, foi realizado o estudo de citotoxicidade, realizado previamente nos ensaios da atividade antiviral, utilizando as Vero Cells, consistindo em um estudo *in vitro*. Também foram realizados estudos *in vivo*, utilizando ratos Wistar com o propósito de averiguarmos a toxicidade aguda dos óleos essenciais das espécies vegetais. Com isso, a avaliação toxicológica (citotoxicidade, toxicidade aguda, toxicidade crônica, irritação dérmica e ocular) é de fundamental importância para determinar a segurança na utilização destas plantas (FOGLIO et al., 2006).

Os resultados estão apresentados na forma de artigos científicos, relacionando a composição química, atividades biológicas e estudo de toxicidade, os quais estão dispostos da seguinte forma: o primeiro manuscrito trata da atividade repelente em cupins de madeira seca; o segundo está relacionado com as

atividades antiviral e antioxidante, e ainda, sobre a toxicidade aguda em ratos; o terceiro mostra a atividade antitumoral das nanoemulsões e óleos essenciais em linhagens humanas de células de Glioma e tumor de bexiga; o quarto avalia a atividade antifúngica das formulações e óleos essenciais e o último, o poder larvicida frente às formas imaturas do mosquito da dengue.

Desta maneira, é importante ressaltar que todos os ensaios biológicos, o estudo toxicológico, e a elaboração e caracterização das nanoemulsões dos óleos essenciais foram realizados pela primeira vez para as duas espécies vegetais, destacando a importância e ineditismo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a composição química, o potencial antioxidante, antiviral, inseticida, antitumoral, antifúngico, avaliação toxicológica aguda e também formular e caracterizar duas nanoemulsões dos óleos voláteis das duas espécies do estudo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) realizar a extração dos óleos essenciais das folhas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis* por hidrodestilação;
- b) estabelecer sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo a composição química dos óleos essenciais de *D. angustifolia* (folhas) e *D. brasiliensis* (folhas) por Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de Massas (CG/EM);
- c) avaliar o efeito inseticida dos óleos essenciais frente à espécie de cupim *Cryptotermes brevis* para os óleos essenciais das folhas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis*;
- d) avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos óleos essenciais das folhas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis* frente ao Herpes vírus humano tipo 1;
- e) avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis* por DPPH;
- f) avaliar a toxicidade aguda em ratos Wistar tratados com os óleos essenciais das folhas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis*, segundo metodologia proposta pela OECD para avaliação toxicológica de fitoterápicos;
- g) formular e caracterizar as duas nanoemulsões feitas a partir dos óleos essenciais extraídos das duas espécies;
- h) avaliar o potencial antitumoral frente às linhagens de tumor de bexiga e glioma humano dos óleos essenciais e nanoemulsões das duas espécies;

- i) avaliar o potencial antifúngico frente às leveduras e fungos filamentosos dos óleos essenciais e nanoemulsões das duas espécies;
- j) avaliar o potencial larvicida das nanoemulsões e óleos essenciais das duas espécies frente às larvas de *Aedes aegypti*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são substâncias orgânicas extraídas de plantas, sendo uma matéria-prima de grande importância para indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Conforme a espécie podem estar presentes em diversas partes como folhas, caule, sementes, frutos, etc. São constituídos por substâncias de diversas funções orgânicas, como hidrocarbonetos terpênicos ou aromáticos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e éteres entre outras, podendo ser obtidos por várias técnicas, destacando-se em escala comercial, hidrodestilação, arraste de vapor, extração por solventes orgânicos e por pressão (PAINTER, 1951; ANAYA et al., 1974; YUNES, 2007).

Os óleos essenciais têm sido utilizados há mais de 2.000 anos, principalmente por suas propriedades bactericidas, sendo seu uso como condimentos, associado à higiene alimentar. Atualmente, são usados como aromatizantes, edulcorantes, odoríferos em perfumaria, indústria alimentícia e farmacêutica, bem como matéria-prima para semi-síntese ou devido às suas propriedades farmacológicas próprias (DOMINGUEZ, 1973; HARBORNE, 1985).

A volatilidade associada aos aromas torna essas substâncias perceptíveis pelos organismos que se interrelacionam, permitindo o estabelecimento de um elo de comunicação entre a fonte produtora e o meio ambiente, conferindo-lhes importantes funções ecológicas: ao mesmo tempo que essas substâncias podem servir de atrativos para insetos e outros animais polinizadores e dispersores, elas podem atuar como repelentes constituindo um meio de defesa frente a predadores (microrganismos, fungos, insetos e herbívoros) ou apresentar ação tóxica sobre as germinações (BRUNETON, 1992, YUNES, 2007).

3.2 *Drimys angustifolia* E *Drimys brasiliensis*

A família Winteraceae é considerada uma das mais arcaicas famílias de angiospermas com ocorrência restrita em matas temperadas, como o sul da América do Sul (LORENZI; ABREU MATOS, 2002). O gênero *Drimys* é o de maior área de distribuição geográfica da família, que compreende 7 gêneros e cerca de 120 espécies. Este gênero apresenta as espécies *Drimys winteri*, *Drimys granadensis*, *Drimys brasiliensis* e *Drimys angustifolia* que são classificadas por suas características morfológicas, anatômicas e cariotípicas (EHRENDORFER et al., 1979).

No continente americano, a área de ocorrência estende-se desde o extremo sul da Argentina e Chile até o México, pertencendo ao gênero *Drimys* seção *wintera* (MARCHIORI, 1997; MALHEIROS, 2001). Segundo Joly (1985), o gênero é restrito às regiões de climas temperados. No Brasil, encontra-se desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (BACKES; NARDINO, 1999) e ocorre em duas espécies, *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis*, conhecidas popularmente como “casca-de-anta”. As folhas e cascas são usadas na medicina popular como antiescorbútico, estimulante, antiespasmódica, antidiarreica, antifebril e antibacterianas (ALMEIDA, 1993), no tratamento de asma e bronquite e com propriedades inseticidas (DA CUNHA et al., 2001). Ambas são caracterizadas pela presença de flavonoides e sesquiterpenoides (SCOPEL et al., 2002).

As espécies do sul do Brasil também são utilizadas como estimulante, antiespasmódica, aromática, antidiarreica, antifebril, contra hemorragia uterina, em certas afecções do trato digestivo e, algumas vezes no tratamento do câncer (SIMÕES et al., 1986). Devido a esses usos, o estudo da composição química, atividade biológica e toxicidade são de grande interesse farmacêutico.

3.3 NANOEMULSÕES

Nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsionante. Suas propriedades físico-químicas, influenciadas pela composição quali e quantitativa e pelas condições de preparação, devem ser estritamente controladas, visando à administração por via parenteral e a estabilidade do sistema (KLANG; BENITA, 1998; HUNG et al., 2007).

Apesar da instabilidade termodinâmica, as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de substâncias. Estudos recentes descrevem a possibilidade de redução de toxicidade, aumento de atividade, janela terapêutica e biodisponibilidade e, em alguns casos, uma liberação controlada e direcionada de substâncias incorporadas nesses sistemas (TAMILVANAN, 2004; DATE; NAGARSENKER, 2008; WANG et al., 2008).

O direcionamento das substâncias a determinados tecidos pode ocorrer de forma passiva e/ou ativa (TAMILVANAN, 2009). O direcionamento passivo ou natural baseia-se no fato das emulsões serem reconhecidas como corpos estranhos ao organismo e serem captadas por tipos celulares específicos, permitindo o direcionamento ao sistema fagocítico mononuclear; ou, ainda, no fato de alguns tecidos possuírem capilares fenestrados, isto é, com espaços intercelulares epiteliais maiores que capilares normais, permitindo a passagem e o acúmulo das nanoemulsões injetadas na corrente circulatória, como no caso de alguns tumores (MÜLLER; HEINEMANN, 1993; WANG et al., 2002 TAMILVANAN, 2009).

3.4 ATIVIDADE INSETICIDA

Estima-se que aproximadamente 90.000 espécies de insetos sejam consideradas pragas no mundo. Elas provocam grandes prejuízos às principais culturas, podendo proporcionar perdas na produção que variam de 2 a 28%

(ZUCCHI et al., 1992). Pesticidas são necessariamente inseticidas que garantem a proteção de plantas. Por outro lado, como resultado de mais de um ano de aplicação do mesmo inseticida, os insetos se tornam resistentes; por isso, os inseticidas devem ser continuamente renovados e inseticidas com novos mecanismos de ação devem ser obtidos para evitar a resistência. Por essa razão, a aplicação de inseticidas organoclorados e organofosforados tiveram seu uso descontinuado no devido tempo, e foram substituídos pelos piretróides. Entretanto, nos últimos anos insetos se tornaram mais resistentes aos piretróides, e seu uso será muito restrito em breve. Uma das alternativas aos piretróides foram os novos inseticidas chamados de neonicotinóides. O mecanismo de atividade inseticida dos neonicotinóides é baseado na sua habilidade de ligação com o receptor nicotínico dos insetos (KOVGANKO, 2004). Contudo, independente da categoria, os inseticidas são geralmente potentes neurotóxicos, em maior ou menor extensão. Uma alternativa que tem sido vista como promissora para mitigar o risco do uso destes tóxicos é o uso de óleos essenciais, sobretudo os seus constituintes terpênicos (JUNIOR, 2003).

Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida (JUNIOR, 2003). Dentre os diversos estudos relacionados com os terpenos, observou-se que alguns monoterpenos apresentam atividade inseticida (HARBORNE, 1993).

Muitos estudos utilizando os óleos essenciais mostram que componentes em mistura ou isolados podem apresentar atividade repelente contra insetos atribuída aos monoterpenos e sesquiterpenos contidos nestes óleos. Dentre os isolados podemos citar: alfa-pineno, limoneno, citronelol, citronelal, cânfora e timol. Pode ainda ocorrer o sinergismo quando em mistura (NERIO et al., 2010).

Nos últimos anos, óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biocidas (SIMAS et al., 2004, AUTRAN et al., 2009) como, por exemplo, óleo de *Mentha pulegium* e *M. spicata*. Os monoterpenos pulegona, mentona e carvona, os principais constituintes do óleo de menta, foram considerados tóxicos para larvas de *Drosophila melanogaster* (FRANZIOS et al., 1997). Um trabalho de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o óleo essencial de

D. brasiliensis foi efetivo contra uma espécie de carrapato bovino e a carrapato canino (RIBEIRO et al. 2008).

3.4.1 Cupins

Conhecido como cupim-da-madeira-seca, a espécie *Cryptotermes brevis* Walker, é comumente encontrada no Brasil, sendo uma espécie não nativa. A alta toxicidade dos produtos químicos convencionais utilizados no combate aos cupins, que quase sempre são acompanhados pelo aparecimento de resistência por parte dos organismos e, com o tempo, promovendo efeitos cumulativos sobre o ambiente, favorecendo o desequilíbrio no ecossistema, tem motivado o interesse de estudos envolvendo métodos alternativos de controle de insetos-praga, incluindo os cupins (LOSS, 2008).

As pesquisas com produtos naturais derivados de plantas podem ser realizadas, principalmente, visando a descoberta de moléculas com atividade contra insetos que permitam a formulação de novos inseticidas naturais para uso direto no controle de pragas (LOSS, 2008).

3.4.2 *Aedes aegypti*

O dengue é a arbovirose de maior incidência no mundo, sendo endêmica em todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de dois terços da população mundial vivem em áreas infestadas com mosquitos vetores do dengue, especialmente o *Aedes aegypti*, onde circulam algum dos quatro sorotipos do vírus, em alguns casos, simultaneamente. A forma hemorrágica da doença surgiu nas Américas em 1981, trinta anos depois de seu aparecimento na Ásia, e tem mostrado uma incidência crescente (TAUIL, 2002; PINHEIRO; CORBER, 1997).

O *A. aegypti*, principal vetor responsável pela transmissão do dengue, é um mosquito de hábitos doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para deposição dos ovos, os quais têm uma alta capacidade de resistir à dessecação. O *A. aegypti* tem revelado grande capacidade

de adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002; WHO, 2002). O método mais utilizado nos últimos vinte anos para o controle do *A. aegypti* é a aplicação de inseticidas a ultrabaixo volume (ULV). O pequeno impacto desse método na circulação viral tem levado a uma reavaliação das estratégias de controle (PAHO, 1995).

3.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL

Infecções, em seres humanos, pelos vírus herpes (VHS) foram inicialmente documentadas na Grécia Antiga. Hipócrates usou a palavra “herpes”, cujo significado, em grego, é rastejar ou engatinhar, para descrever lesões que apareciam umas próximas às outras. Embora a natureza vesicular das lesões associadas com infecções herpéticas tenha sido bem caracterizada previamente, só em 1893, Vidal reconheceu a transmissão interpessoal das infecções herpéticas. Estes vírus são responsáveis por uma gama de infecções que vão desde erupções cutâneas até quadros graves de encefalite (FONSECA, 1999).

Algumas plantas e seus óleos isolados mostraram atividade frente ao VHS-1 e VHS-2 (BAKKALI et al., 2008). A espécie *Hypericum connatum* Lam. foi ativa frente ao VHS-1, o que mostra que a utilização de vegetais e de seus metabólitos pode mostrar-se promissora contra tal infecção viral (FRITZ, 2007). Outro exemplo é o da espécie *Melissa officinalis* L. que apresentou atividade frente ao VHS-2 (ALLAHVERDIYEV, 2003).

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são intermediários da redução parcial do oxigênio, produzidos por reações bioquímicas nos organismos vivos eucarióticos, durante o processo de fotossíntese e de respiração mitocondrial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O desequilíbrio entre a geração de EROs e os mecanismos de desintoxicação destas espécies no organismo, com uma conseqüente elevação

da concentração de radicais livres nas células, acarreta o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996).

Muitas evidências têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças crônicas, tais como arteriosclerose, câncer, e doenças degenerativas (COOK; SAMMAN, 1996; BILICI et al., 2001; BEAL, 2002; EL SHERBINY et al., 2003; CAI et al., 2004). Dessa forma, a utilização de substâncias com capacidade antioxidante pode ser de grande relevância na prevenção e terapêutica de doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo.

3.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os produtos naturais têm sido uma importante fonte de componentes antineoplásicos. Existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1000 apresentam propriedades antitumorais significantes (FERRAZ et al., 2005; MUKHERJEE et al., 2001).

As quimioterapias convencionais causam intensos efeitos colaterais, com taxa de sucesso limitada devido à concentração insuficiente da droga, alta toxicidade sistêmica, ausência de seletividade, além de colaborarem para resistência desses tumores após tratamento prolongado. Para superar tais limitações desses agentes algumas estratégias têm sido utilizadas para que estes quimioterápicos possam ser ativados seletivamente no tecido tumoral (XU; MCLEOD 2001). Dessa forma, estudos com substâncias naturais podem colaborar para o maior entendimento da capacidade das mesmas em permitir a modulação de sinais de apoptose (NOBILI et al., 2009).

A comprovada ação citotóxica dos óleos essenciais constitui em uma alternativa de amplo campo de estudos na terapia contra o câncer. Diversas espécies vegetais que apresentam tais substâncias em sua composição apresentam imenso potencial antitumoral (BAKKALI et al., 2008)

3.8 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando um aumento expressivo, sendo as dermatomicoses as principais infecções responsáveis por esse aumento. Vários fatores estão relacionados ao crescimento dessas infecções fúngicas, entre eles: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o emprego de medicamentos imunossupressores, utilizados às vezes de forma abusiva, permitindo a instalação de microorganismos convencionalmente saprófitos (SIDRIM et al., 1999).

Neste contexto, embora a maioria dos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, o estudo de produtos naturais voltou a receber a atenção dos cientistas (YUNES; FILHO, 2001). Entre as principais ferramentas na busca de novos modelos moleculares estão a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo farmacológico das preparações utilizadas, abordadas, respectivamente no âmbito da Etnobotânica e da Etnofarmacologia (RATES, 2001).

O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade e alto custo. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes. Além das infecções em humanos, os animais também podem ser atacados esporadicamente por fungos muito difíceis de serem combatidos (FENNER et al., 2006).

Dentre os diversos tipos de micoses, é importante destacar as infecções causadas pelo fungo do gênero *Ascremonium*. As espécies deste fungo são responsáveis por infecções em pacientes internados em Unidades de tratamento intensivo (UTI) e ainda, em pacientes imunocomprometidos, sendo responsáveis por infecções cardíacas, nasais, cutâneas, micetomas dentre outras (GUARRO et al., 2009; DURBEC et al., 2011; AGARWAL et al., 2011).

A comprovada ação antifúngica dos óleos essenciais constitui em uma alternativa no tratamento das micoses. Diversas espécies vegetais que apresentam

os tais substâncias em sua composição apresentam imenso potencial antifúngico (BAKKALI et al., 2008).

3.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

O surgimento do conceito de “natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa a “ausência de produtos químicos”, que são aqueles que podem causar algum dano ou, de outra forma, representa perigo (MENGUE et al., 2001). O desconhecimento por parte da população sobre efeitos secundários e toxicidade de espécies utilizadas habitualmente pode levar a consequências sérias (NAVARRO MOLL, 2000).

Existe um número cada vez maior de estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas antes usadas sem restrições e de forma indiscriminada. Espécies como a kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst, Piperaceae) foram responsáveis por dezenas de casos de hepatotoxicidade na Europa (STICKEL et al., 2003; WHITTON et al., 2003; CLOUATRE, 2004). No Brasil, na década de 80, o confrei (*Symphytum officinale* L. Boraginaceae) foi disseminado como planta para a cura de diversas doenças, inclusive o câncer. Estudos posteriores demonstraram o risco do uso interno desta planta, altamente hepatotóxica (BRASIL, 1992; BARRACA, 1999; STICKEL; SEITZ, 2000). Mas o que se vê é que ainda hoje diversas plantas são usadas de forma irracional (OLIVEIRA; GONÇALVES, 2006).

Para o desenvolvimento de substâncias com potencial farmacológico é essencial a avaliação de possíveis efeitos adversos, incluindo os tóxicos. Uma substância deve ser avaliada pré-clinicamente quanto ao seu potencial de toxicidade como forma de prever possíveis efeitos adversos agudos e crônicos, sobre a reprodução ou mesmo sobre o desenvolvimento neurológico, muito antes de dar início a fases superiores de rastreamento que incluem os testes clínicos. Agências reguladoras como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o FDA (Food and Drugs Administration), a EPA (Environmental Protection Agency), exigem como testes preliminares de toxicidade *in vivo*, entre outros, os ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e reprodutiva. Atualmente, a OECD (Organization for

Economic Co-operation and Development), regulamenta os protocolos aceitos internacionalmente para tais ensaios biológicos. O delineamento de ensaios farmacológicos e toxicológicos permite um grande avanço nos estudos com plantas medicinais (BARROS, 2003).

PARTE II

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Chemical composition and repellency of essential oils of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers against dry wood termite *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae)

Artigo aceito na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada e apresentado na forma de abstract

Chemical composition and repellency of essential oils of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers against dry wood termite *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae)

Madson Ralide Fonseca Gomes, Gilcéia Guadagnin Dorneles, Roselena Silvestri Schuh, Ana Laura Bemvenuti Jacques, Lúcia Rosane Bertholdo-Vargas; Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, Renata Pereira Limberger

ABSTRACT

The essential oils obtained from leaves of the Southern Brazilian native *Drimys angustifolia* Miers (DA) and *Drimys brasiliensis* Miers (DB) were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The oil of DA was characterized by monoterpenoids and sesquiterpenoids, bicyclogermacrene (19.6%), followed by sabinene (9.7%) and mircene (5.2%). The oil of DB was characterized by sesquiterpenoids and monoterpenoids, cyclocolorenone (18.2%), followed by terpinen-4-ol (8.7%) and alpha-gurjunene (6.9%). Laboratory tests were carried out to determine the repellent potential of the essential oils against dry wood termite *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae) by repellency test. It was observed that the oil showed repellency at the doses of 25, 12.5, and 6.25 µg/mL. Both species showed negative repellency index, which represents repellency activity, except the highest concentration of DA, which was attractive. Five deaths were observed in the 25 µg/mL concentration of DA, accounting for 11% of deaths in four hours of

analysis. Four deaths occurred in the concentration of 12.5 µg/mL, accounting for approximately 9% of deaths. The essential oil of DB did not cause deaths in termites.

Keywords: monoterpenoids; sesquiterpenoids; *Drimys angustifolia*; *Drimys brasiliensis*; *Cryptotermes brevis*

CAPÍTULO 2

Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers

Artigo aceito na Revista Brasileira de Farmacognosia e apresentado na forma de abstract.

Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers

Madson Ralide Fonseca Gomes,^{1*} Ana Laura Bemvenuti Jacques,¹ Roselena Silvestri Schuh,¹ Gilcéia G. Dorneles,¹ Jarbas Alves Montanha,² Paulo Michel Roehe,² Sérgio Bordignon,³ Eliane Dallegrave,⁴ Mirna B. Leal,⁵ Renata Pereira Limberger¹.

¹Laboratório de Toxicologia – Faculdade de Farmácia – UFRGS

²Laboratório de Virologia / Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Departamento de Microbiologia (UFRGS)

³Laboratório de Botânica – Departamento de Morfologia Vegetal – UNILASALLE

⁴Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul – CIT – FEPPS

⁵Laboratório de Farmacologia – Instituto de Ciências Biológicas - UFRGS

ABSTRACT: The genus *Drimys* presents the widest geographical distribution of the Winteraceae family, which comprises seven genera and about 120 species. In Brazil, the genus is found from Bahia to Rio Grande do Sul and occur in two species, *D. angustifolia* Miers and *D. brasiliensis* Miers, popularly known as "casca-de-anta", characterized by the presence of flavonoids and essential oils. It is used in folk medicine as an antiscorbutic, stimulant, antispasmodic, anti-diarrheal, antipyretic, antibacterial, and against asthma and bronchitis, besides having insecticidal properties. In addition to the known biological activities, it is very important to explore new applications in the treatment of physiological disorders or diseases caused by parasites. Based on this information, in this study we propose to evaluate volatile oils of the species *D. brasiliensis* and *D. angustifolia*, as an antioxidant, using the model of the DPPH radical as an antiviral against human herpes virus type 1 (HSV-1) and acute toxicity in vivo. The two species were not able to reduce the DPPH radical and showed interesting antiviral activity, significantly reducing the virus titers in in vitro assays. Regarding the in vivo toxicity in female Wistar rats, treatment with the two species showed interesting signs in animals such as salivation, ptosis, tremor, decreased motor activity. In addition the oils of *D. brasiliensis* to other signs, some animals showed increased urination and diarrhea.

Keywords: *D. angustifolia*, *D. brasiliensis*, essential oils, antioxidant, antiviral, acute toxicity.

CAPÍTULO 3

Citotoxic activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis* on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines *in vitro*

Artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia apresentando na forma de abstract.

Citotoxic activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis* on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines *in vitro*

Madson R. F. Gomes,^{*,1} Roselena S. Schuh,¹ Ana L. B. Jacques,¹ Otávio A. Augustin,¹ Sérgio A. L. Bordignon,² Daiane O. Dias,³ Regina G. Kelmann,³ Letícia S. Koester,³ Marina. P. Gehring,⁴ Fernanda B. Morrone,⁴ Maria M. Campos,⁵ Renata P. Limberger¹

¹Laboratório de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

²Laboratório de Botânica, Centro Universitário La Salle, Canoas, Brasil,

³Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil,

⁴Laboratório de Farmacologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil,

⁵Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

The species *Drimys angustifolia* Miers and *D. brasiliensis* Miers, commonly known as "casca-de-anta", have in their leaves essential oils that can confer cytotoxic effects. In this study, we evaluated the cytotoxic effects of the volatile oils from these two species. We also proposed a nanoemulsion formulation for each of the species and assessed the *in vitro* cytotoxicity on U-138 MG (human glioblastoma) and T24 (human bladder carcinoma) cell lines. The plant chemical composition was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometer. Furthermore, the nanoemulsions were prepared and characterized. Our results showed that; bicyclogermacrene (19.6%) and cyclocolorenone (18.2%) were the most abundant for the *D. angustifolia* oil and *D. brasiliensis* oil, respectively. Both nanoemulsions, *D. angustifolia* and *D. brasiliensis* appeared macroscopically homogeneous and opalescent bluish liquids, with nanometric mean diameters of 168 nm for *D. brasiliensis* and 181 nm for *D. angustifolia*. The polydispersity indices were below 0.10, with an acid pH of 4.7-6.3, and negative zeta potentials about -34 mV. The results of transmission electron microscopy showed that droplets are present in the

nanometer range. Only the *D brasiliensis* oil was efficient in reducing the cell viability of both U-138 MG (42.5%±7.0 and 67.8%±7.8) and T24 (33.2%±2.8, 60.3%±1.6 and 80.5%±8.8) cell lines, as assessed by MTT assay. Noteworthy, similar results were obtained with cell counting. Finally, *D brasiliensis* oil incubation caused an increase of annexin-V and propidium iodide population, according to evaluation by cytometry analysis, what is characteristic of late apoptosis. The results presented herein lead us to consider the potential therapeutic effects of the essential oils and nanoformulations as novel strategies to inhibit tumor growth.

Keywords: bladder carcinoma, *Drimys angustifolia*, *Drimys brasiliensis*, essential oils, glioblastoma, nanoemulsions

CAPÍTULO 4

Antifungal activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers.

Artigo a ser submetido apresentado na forma de abstract.

Antifungal activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* L. and *Drimys brasiliensis* Miers.

Madson R. F. Gomes*,¹ Roselena S. Schuh,¹ Ana L. B. Jacques,¹ Otávio A. Augustin,¹ Sérgio A. L. Bordignon,² Daiane O. Dias,³ Regina G. Kelmann,³ Letícia S. Koester,³ Fernanda K. Silva⁴, Alexandre M. Fuentefria⁴, Renata P. Limberger¹

¹Laboratório de Toxicologia – Faculdade de Farmácia – UFRGS

²Laboratório de Botânica – Unilasalle

³Laboratório de Desenvolvimento Galênico – Faculdade de Farmácia – UFRGS

⁴Laboratório de Micologia – Faculdade de Farmácia – UFRGS

Abstract

In Brazil, the *Drimys* genus is found from Bahia to Rio Grande do Sul and occurs in two species, *D. angustifolia* L. (DA) and *D. brasiliensis* Miers (DB), commonly known as "Casca-de-Anta." These plants are characterized by the presence of flavonoids and essential oils. These substances are volatile, natural, complex compounds characterized by known for their antiseptic, i.e. bactericidal, virucidal and fungicidal. The incidence and prevalence of invasive fungal infections have increased since the 1980s, especially in the large population of immunocompromised patients and/or those hospitalized with serious underlying diseases. The development of new antifungal drugs has been constantly required in the clinical therapy. Thus, in this study evaluated the antifungal activity of essential oils of both species and their respective nanoemulsions against 20 fungi: *Candida albicans* (ATCC 24433), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (QU134), *C. glabrata* (HCCGL 01), *C. tropicalis* (ATCC 750), *Cryptococcus neoformans* (CRY01), *Trichosporon asahii* (HCTAS 01), *Microsporium canis* (MCA 36), *Tricophyton rubrum* (TRU 06), *Tricophyton mentagrophytes* (TME 23), *Microsporium gypseum* (MGY 35), *Epidermophyton floccosum* (EPF 32), *Scytalidium dimidiatum* (SCY 04), *Pseudallescheria boydii* (PBO 20), *Acremonium* sp. (ACR 06), *Acremonium nepalense* (IOC 1938), *Acremonium strictum* (URM 6081), *Acremonium rutilum* (URM 3154), *Fusarium* sp. (FUS 01). Among several strains tested, essential oils of both species were active only at strains of *Acremonium*.

Keywords: *Drimys angustifolia*, *Drimys brasiliensis*, essential oils, antifungal, *Acremonium*.

CAPÍTULO 5

Evaluation of the larvicidal potential of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers against *Aedes aegypti*

Artigo a ser submetido apresentado na forma de abstract.

Evaluation of the larvicidal potential of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers against *Aedes aegypti*

Madson R. F. Gomes*,¹ Roselena S. Schuh,¹ Ana L. B. Jacques,¹ Otávio A. Augustin,¹ Sérgio A. L. Bordignon,² Daiane O. Dias,³ Regina G. Kelmann,³ Letícia S. Koester,³ Josiane S. Prophiro⁴, Onilda Santos da Silva⁴, Renata P. Limberger¹

¹Laboratório de Toxicologia – Faculdade de Farmácia – UFRGS

²Laboratório de Botânica – Unilasalle

³Laboratório de Desenvolvimento Galênico – Faculdade de Farmácia – UFRGS

⁴Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UFRGS

Abstract

The arbovirus is transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes, which has become a serious problem of international public health in recent decades. In Brazil, this mosquito species is the main vector of dengue virus, and it has been found in about 3,600 Brazilian municipalities, and dengue outbreaks have repeatedly occurred. During outbreaks, Brazilian public health authorities have standardized the use of conventional pesticides such as malathion and pyrethroids. However, these insecticides have certain disadvantages, such as high costs, risks to human health and non-target organisms, bioaccumulation, and developing resistance of target organisms. The species *Drimys angustifolia* L. (DA) and *Drimys brasiliensis* Miers. (DB), commonly known as "Casca-de-Anta", have in their leaves essential oils that can confer insecticide activity. The plant chemical composition was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometer. Furthermore, the nanoemulsions were prepared and characterized. Our results showed that; bicyclogermacrene (11.8%) and cyclocolorenone (27.4%) were the most abundant for the DA oil and DB oil, respectively. Both nanoemulsions, DA and DB appeared macroscopically homogeneous and opalescent bluish liquids, with nanometric mean diameters of 168 nm for DB and 181 nm for DA. The polydispersity indices were below 0.10, with an acid pH of 4.7-6.3, and negative zeta potentials about -34 mV. Only DB nanoemulsion was great active and showed promising larvicidal potential against *A. aegypti*.

Keywords: *Drimys angustifolia*, *Drimys brasiliensis*, nanoemulsions, essential oils and larvicidal activity.

PARTE II

DISCUSSÃO GERAL
CONCLUSÕES

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular; isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados; transformações químicas de princípios ativos; estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (FOGLIO et al., 2006).

A extração por hidrodestilação e análise por CG/EM das duas espécies do estudo revelaram que a composição química foi de óleos essenciais, sendo que para cada espécie foram identificados componentes majoritários específicos. Para a *D. angustifolia* foi o sesquiterpeno hidrocarbonado biciclogermacreno, para *D. brasiliensis* foi o sesquiterpeno oxigenado ciclocolorenona (LIMBERGER, 2007). Tal composição, às credenciam aos estudos das atividades inseticida, antiviral, antioxidante, antitumoral e antifúngica testadas neste trabalho (YUNES, 2007; CUETO et al., 2011 SOARES et al., 2011; SOUZA et al., 2011). Além das atividades biológicas, estudos toxicológicos foram realizados, os quais são de fundamental importância para assegurar o uso de plantas medicinais pela população (FOGLIO et al., 2006).

As nanoemulsões foram caracterizadas como homogêneas e opalacentes no aspecto macroscópico. Suas características físico-químicas apresentaram características nanométricas com tamanhos de partícula, o que foi comprovado com a microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, os potenciais de polidispersão e potencial zeta, apresentaram-se com valores satisfatórios (NUCHUCHUA et al., 2009; SAKULKU et al, 2009).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o óleo essencial de *D. brasiliensis* foi efetivo contra uma espécie de carrapato bovino e a carrapato canino (RIBEIRO et al., 2008). Com esta promissora atividade, tivemos o interesse de testar os óleos em outro inseto a fim de averiguar se tal atividade persistia. Na atividade inseticida frente ao cupim de madeira seca, as duas espécies mostraram ser repelentes, com exceção da concentração de 25 µg/mL da espécie *D. angustifolia* que foi atraente e ainda causou a morte de 11% dos cupins do experimento e a concentração de 12,5

$\mu\text{g/mL}$ que causou a morte de 9%. A espécie *D. brasiliensis* não levou os cupins à morte. Estas atividades podem ser atribuídas aos componentes majoritários dos óleos essenciais ou ainda a todos os componentes, conferindo sinergismo para a atividade testada (NERIO et al., 2010). Neste caso tal atividade poderia ser atribuída ao biciclogermacreno para *D. angustifolia* e à ciclocolorenona para *D. brasiliensis*.

É interessante notar que as diferenças químicas e teor de compostos oxigenados e hidrogenados favoreceram ou não determinadas atividades observadas no presente estudo. Quanto à atividade inseticida frente ao cupim de madeira seca, a espécie DA, foi repelente e tóxica, matando inclusive alguns cupins. Sua composição é principalmente, de compostos hidrogenados com o componente majoritário biciclogermacreno. Já a espécie DB, foi apenas mais repelente que a primeira mostrando índices de repelências mais negativos, com predominância de compostos oxigenados. A maior volatilidade dos compostos hidrogenados reduz a repelência, em relação aos óleos que contem compostos oxigenados em sua maioria (NERIO et al., 2010).

Nos estudos prévios avaliando o potencial larvicida frente *Aedes aegypti*, apenas a nanoemulsão de *D. brasiliensis*, foi capaz de levar a morte das larvas do mosquito da dengue, apresentando 89 e 69% de mortalidade nas concentrações de 0,83 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os óleos não apresentaram poder larvicida nas mesmas concentrações, tal fato pode ser explicado pela redução no tamanho das partículas o que favoreceu a penetração da nanoemulsão em relação aos óleos (SHAH et al., 2010). Sem contar, na composição química do óleo que diferem entre ambos. É importante, ressaltar que o teor de óleo nas nanoemulsões é de apenas 4%.

Os óleos das duas espécies não foram capazes de reduzir o radical DPPH. Em relação à atividade antiviral frente ao herpes vírus humano tipo 1, as duas espécies apresentaram significativa atividade, inibindo e impedindo a contaminação das células e a replicação do vírus. A atividade antiviral é considerada moderada com reduções dos títulos de vírus de 0,5 a 0,9 do \log_{10} (SIDWELL; HUFFMAN, 1971). Outras plantas que apresentam óleos essenciais em sua composição também tiveram atividade frente ao vírus testado neste trabalho, confirmando assim o potencial antiviral dos óleos e das espécies do estudo (BAKKALI et al., 2008).

No teste de citotoxicidade realizado previamente para os ensaios antivirais, a espécie *D. angustifolia* foi mais tóxica que a espécie *D. brasiliensis*, sendo a máxima concentração não tóxica foram 156,3 µg/mL e 625 µg/mL, respectivamente. Aproveitando, os dados da citotoxicidade em Vero cels, os estudos voltados à atividade antitumoral em células de glioma humano (U-138 MG) e tumor de Bexiga (T24), mostraram importante atividade, em especial o óleo de *D. brasiliensis*, o qual foi eficaz frente às duas linhagens. Tal fato pode ser explicado pela presença de 45,5% de compostos oxigenados, que conferem maior poder citotóxico (BRUNI et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005). As concentrações de 250 e 500 µg/mL foram muito eficientes, reduzindo a viabilidade celular em 42,5% e 67,8%, respectivamente na linhagem U-138 MG e nas concentrações de 125, 250 e 500 µg/mL, com a redução de 33,2%, 60,3% e 80,5%, respectivamente para a linhagem T24. Podemos observar que os valores das concentrações são bem abaixo da concentração máxima não tóxica que é de 625 µg/mL, dos ensaios prévios de citotoxicidade em Vero cels.

A espécie *D. angustifolia*, apresentou menor quantidade de compostos oxigenados, com apenas 14%, o que pode ter contribuído para sua menor atividade nas linhagens testadas. Mesmo assim, apresentou atividade na linhagem U-138 MG com a redução de 35% na viabilidade celular na concentração de 500 µg/mL. E na linhagem T24, reduziu a viabilidade significativamente, nas concentrações de 500 e 250 µg/mL, com percentuais de 36,7 e 73,7% respectivamente. É importante lembrar, que os componentes majoritários desta espécie são compostos hidrogenados (BRUNI et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005, BAKKALI et al., 2008). Em relação às nanoemulsões, ambas foram reduziram a viabilidade celular na linhagem T24. A nanoemulsão de *D. angustifolia* nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, com 26,1 e 65,7%, respectivamente. A nanoemulsão de *D. brasiliensis* reduziu a viabilidade apenas na concentração de 500 µg/mL, com a redução em torno de 20%.

Em relação à atividade antifúngica, dentre as espécies testadas, leveduras e fungos filamentosos, apenas o gênero *Acremonium sp.* foi inibido pelos óleos das duas espécies vegetais. As nanoemulsões não foram capazes de inibir nenhuma cepa testada. As concentrações inibitórias mínimas ficaram em 500 µg/mL.

No estudo de toxicidade aguda os animais tratados apresentaram sinais de ptose, tremor, redução da atividade motora, exolftamia, aumento da frequência respiratória. Os animais tratados com espécie *D. brasiliensis* ainda apresentaram aumento na micção e diarréia. Estudos com extratos obtidos do caule e das folhas de *D. angustifolia* demonstraram que mortes só ocorreram com doses superiores a 3500 mg/kg (uma macho e uma fêmea em um grupo de cinco animais cada) e na dose de 5250 mg/kg (um macho e três fêmeas em um grupo de cinco animais cada). Em todas as doses testadas apresentaram exolftamia (WITAICENIS, 2007). Outro ponto importante, é que não houve mudança na massa corporal dos animais, a qual, é um indicador de toxicidade.

Desta maneira, os óleos essenciais da espécie *Drimys angustifolia* apresentaram interessante atividade repelente contra cupins de madeira seca, foram antivirais frente ao VHS-1, possuindo promissora atividade antitumoral frente às linhagens U-138 MG e T24. Não reduziu o radical DPPH, portanto não apresenta atividade antioxidante por este modelo e inibiu o crescimento do fungo filamentososo do gênero *Acremonium*. A sua nanoemulsão apresentou importante atividade antitumoral frente à linhagem T24. Apresentou importantes sinais de toxicidade no estudo de toxicidade aguda. Por outro lado, a espécie *Drimys brasiliensis*, mostrou-se eficaz na atividade repelente contra cupins, bem como, interessante atividade frente ao VHS-1 e excelente atividade antitumoral para as duas linhagens testadas. Não reduziu o radical DPPH, e também, inibiu o crescimento do fungo do gênero *Acremonium*. Sua nanoemulsão também mostrou interessante atividade antitumoral frente à linhagem T24 além de alta toxicidade frente às larvas do mosquito vetor da dengue, *Aedes Aegypti*.

Podemos concluir que as espécies *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis* possuem um imenso potencial biológico (inseticida, antiviral, antifúngico, antitumoral), bem como suas nanoemulsões, que apresentaram interessantes atividades demonstradas neste estudo. Atividades estas, importantes e de alta relevância na saúde e no cotidiano.

Como perspectivas, um amplo leque de estudos abre-se nos mais variados âmbitos de investigação, tanto dos óleos, quanto das nanoemulsões:

- a) estudos das nanoemulsões como repelente tanto dos cupins como dos adultos do mosquito da dengue;
- b) estudos de toxicidade e mecanismo de ação mais detalhados dos óleos e nanoemulsões nas linhagens testadas e em outras linhagens de células tumorais;
- c) estudos com outros modelos de atividade antioxidante, testar em outras cepas de fungos;
- d) determinar o mecanismo antiviral dos óleos e nanoemulsões;
- e) avaliar todas as atividades biológicas do presente estudo *in vivo* e;
- f) avaliar a toxicidade subcrônica e crônica em camundongos ou ratos, dentre outras.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. et al. First case of *Acremonium kiliense* mycetoma in a New Delhi resident: a brief review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 21, n. 2, p. 130-133, juin 2011.
- ALBUQUERQUE, P. de et al. Medicinal plants of the *Caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, Dec. 2007.
- ALLAHVERDIYEV, A. et al. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7-8, p. 657-661, Nov. 2004.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993.
- ALMEIDA, J. R. G. da S. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, supl. 0, p. 638-641, dez. 2006.
- ANAYA, A. L. et al. Allelopathic activity of the essential oil of *Piper auritum*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ESSENTIAL OILS, 6., 1974, Illinois. **Papers...** Illinois: Allured, 1974. p. 27-28.
- ARENDRUP, M. C. et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4434-4440, Sept. 2005..
- AUTRAN, E. S. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2284-2288, Apr. 2009.
- BACKES, A.; NARDINO, M. **Nomes populares e científicos de plantas do Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: UNISINOS, 1999.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BARRACA, A. S. **Contribuição**: Relatório do Estágio Supervisionado em Produção Vegetal II. "Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas". Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/planmedi/confrei.html>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

BARROS, S. B. de M.; DAVINOS, S. C. Avaliação de toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 9, p. 797-803, 2002.

BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoró: Coleção Mossoroense, 1953.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, Nov. 2008.

BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 09 de março de 2010. Notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**: informações técnicas. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31125>. Acesso em: 11 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria SNVS n 19 de 30.01.92**. Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno. Brasília, DF, 1992.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1992.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, Mar. 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 179-189, Feb. 2000.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 85-96, 2004.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-74, Feb. 1996.

CUETO, Ana Paula et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Cienc. Rural** [online], 2011, v. 41, n. 10, p. 1800-1806, 2011.

CUNHA, F. M. da et al. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. **Life Sci.**, v. 70, n. 2, p. 159-169, Nov. 2001.

DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. **Int. J. Pharm.**, v. 355, n. 1-2, p. 19-30, May 2008.

DEHARO E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, n. 1, p. 91-98, Sept. 2001.

DESMARCHELIER, C. et al. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 288-296, 1997.

DOMINGUEZ, X. A. **Métodos de investigación fitoquímica**. México: Limusa, 1973.

DURBEC, M. et al. Maxillary sinus fungal infection by *Acremonium*. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, v. 128, n. 1, p. 41-43, Jan. 2011.

EHRENDORFER, F. Variation on the population, racial and species level in the primitive relic Angiosperm genus *Drimys* (*Winteraceae*) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 132, p. 53-83, 1979.

EL-SHERBINY, D. A. et al. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, p. 525-533, 2003.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J. Med. Microbiol.** V. 55, pt. 7, p. 809-818, July 2006.

FENNER, Raquel et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online], v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERRAZ, A. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v. 12, p. 112-115, 2005.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, out. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf>. Acesso em: 12 out. 2012.

FONSECA, B. A. L. Clínica e tratamento das infecções pelos vírus herpes simplex tipo 1 e 2. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 147-153, abr./jun. 1999.

FONTES, L. R.; BERTI-FILHO, E. **Cupins: o desafio do conhecimento**. Piracicaba: FEALQ, 1998.

FRANZIOS, G. et al. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 2690-2694, 1997.

FRITZ, D. et al. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 517-520, 2007.

GONÇALO, S. Allergic contact dermatitis from *Bowdichia nitida* (sucupira) wood. **Contact Dermatitis**, v. 26, n. 3, p. 205, Mar. 1992.

GUARRO, J. et al. A case of colonization of a prosthetic mitral valve by *Acremonium strictum*. **Rev Iberoam Micol.**, v. 26, n. 2, p. 146-148, 2009.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HARBORNE, J. B. **Advances in chemical ecology. Natural Product Reports**, v. 10, p. 327-348, 1993.

HARBORNE, J. B. **Introducción a la bioquímica ecológica**. Madrid: Alhambra, 1985.

HINATA, N. et al. Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wildtype - p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells. **Urol. Res.**, v. 31, n. 6, p. 387-396, Dec. 2003.

HUNG, C. F. et al. The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: tocol emulsion versus lipid emulsion. **Int. J. Pharm.**, v. 335, n. 1-2, p. 193-202, Apr. 2007.

IBRAHIM, B. U.; ADEBOTE, D. A. Appraisal of the economic activities of termites: a review. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 84-89, 2012.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 2. ed. São Paulo: Nacional, 1985.

JORGE-NETO, J. Pharmacognostic study of essential oil of sucupira, *Bowdichia virgilioides*. **Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara**, Araraquara, v. 4, p. 203-204, 1970.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, Oct. 2012.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. (Ed.) **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998. p. 127-131.

KOVGANKO, N. V.; KASHKAN, Z. N. Advances in the synthesis of neonicotinoids. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1709-1726, 2004.

LIMBERGER, R. P. et al. Comparative analysis of volatile from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 35 p. 130-137, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1998. v. 1.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOSS, A. C. S. **Bioatividade da cera industrial de lima-ácida (*Citrus latifolia* Tanaka) sobre *Cryptotermes brevis* Walker**. 2008. 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2008.

LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MACHADO, A. Oleo (resin) of “sucupira” (*Bowdichia virgilioides* seeds). **Revista da Associação Brasileira de Farmácia**, v. 17, p. 117-118, 1936.

MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, A. **Estudos químicos farmacológicos e alelopáticos das espécies *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis* (Winteraceae)**. 2001. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria: UFSM, 1997.

MARTINS, J. E. C. **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. São Paulo: CEJUP, 1989.

MELL, C. D. Interesting sources of natural dyestus. **Textile Colorist**, v. 51, p. 453-455, 1929.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MUKHERJEE, A. K. et al. Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.

MÜLLER, R. H.; HEINEMANN, S. Emulsions for intravenous administration. I: Emulsions for nutrition and drug delivery. **Pharmazeutische Industrie**, v. 55, n. 9, p. 853-856, 1993.

NAVARRO MOLL, M. C. Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care Espana**, v. 2, p. 9-19, 2000.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372-378, 2010.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacol. Res.**, v. 59, p. 365-378, 2009.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 36-41, 2006.

PAINTER, R. H. Insect resistance. In: CROP plants. New York: Mc Millon, 1951.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington DC: Pan American Health Organization, 1995. (Scientific Publication, 548).

PAREJO, I. et al. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, p. 1667-1681, 2003.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World Health Stat Q**, v. 50, n. 3-4, p. 161-169, 1997.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Avaliação da atividade anticonvulsivante de plantas do nordeste brasileiro. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 179-184, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIBEIRO, V. L. S. et al. 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.

RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. **Manual de dendrologia brasileira**. 2. ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1990.

SANTANA, A. L. B. D. et al. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 7-12, 2010.

SCOPEL, M. et al. Essential oil from dried and fresh leaves, fruits and stems of *Drymys brasiliensis* (*Winteraceae*). In: CONGRESSO ÍTALO-LATINOAMERICANO DE ETNOMEDICINA, 9., 2002, Pavia, Itália. **Anais...** Pavia: [s.n.], 2002.

SIDRIM, J. J. C.; DIÓGENES, M. J. N.; PAIXÃO, G. C. Dermatofitose. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 108-131.

SIDWELL, R. W.; HUFFMAN, J. H. Use of disposable micro tissue culture plates for antiviral and interferon induction studies. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 797-801, Nov. 1971.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1B, p. 242-248, jan./mar. 2009.

SILVA, B. A. et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 157-167, 2005.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas medicinais: In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos: antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

SIMAS, N. K. et al. Natural products for dengue transmission control: larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids. **Quím. Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas medicinais do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, 1986.

SOARES, *Cristiana Silveira Antunes Soares et al.* Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial do mentrasto (*ageratum conyzoides* L.) Sobre o pulgão da roseira macrosiphum euphorbiae (thomas, 1878), (hemiptera: aphididae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 5, p. 21-24, dez. 2011.

SOUZA, S. P. et al. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 456-466, 2011.

SOUZA, V. H. et al. Avaliação do potencial antidiabético de cinco plantas medicinais em ratos. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 28, n. 4, p. 609-612, 2009.

STICKEL, F. et al. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum* rhizoma). **Journal of hepatology**, v. 39, n. 1, p. 62-67, 2003.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 501-508, 2000.

STYLLI, S. S.; KAYE, A. H. Photodynamic therapy of cerebral glioma: a review: part II: clinical studies. **J. Clinical Neuroscience**, v. 13, p. 709-717, 2006.

TAMILVANAN, S. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body. **Int. J. Pharm.**, v. 381, n. 1, p. 62-76, Oct. 2009.

TAMILVANAN, S. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. **Progress Lipid Res.**, v. 43, n. 6, p. 489-533, Nov. 2004.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 867-871, 2002.

TORRENEGRA, R.; BAUEREISS P.; ACHENBACH, H. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2219-2221, 1989.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, maio/jun. 2003.

WANG, J. J. et al. The delivery and antinociceptive effects of morphine and its ester prodrugs from lipid emulsions. **Int. J. Pharm.**, v. 353, n. 1-2, p. 95-104, Apr. 2008.

WANG, J.; MAITANI, Y.; TAKAYAMA, K. Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin: a carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol, and PEG-lipid. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 4, p. 1128-1134, Apr. 2002.

WHITTON, P. A. et al. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 673-679, 2003.

WITAICENIS, A. et al. Phamacological and Toxicological studies of *Drimys angustifolia* Miers. (Winteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 541-546, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2002.

XU, G.; MCLEOD, H. L. Strategies for enzyme/Prodrug cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3314-3324, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química das plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali Editora, 2007.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

ZUCCHI, R. A.; VENDRAMIM, J. D.; BERTI FILHO, E. Importância dos insetos e manejo de pragas. In: FUNDAÇÃO DE ESTUDOS AGRÁRIOS LUIZ DE QUEIROZ. **Curso de entomologia aplicada à agricultura**. Piracicaba: Ceres, 1992. p. 1-3.

**ANEXO A – REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS BÁSICA E APLICADA
(ACEITE PARA PUBLICAÇÃO)**



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 25 de setembro de 2012.

Ref. RCFBA-132/2012

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

Composição química e repelência de óleos essenciais de *Drimys angustifolia* L. e *Drimys brasiliensis* Miers em cupins de madeira *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae),

De autoria de Madson Ralide Fonseca Gomes, Gilcéia Guadagnin Dorneles, Roselena Silvestri Schuh, Ana Laura Bemvenuti Jacques, Lúcia Rosane Bertholdo-Vargas; Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, Renata Pereira Limberger, foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes

ANEXO B – RFAR-1629 (ACEITE PARA PUBLICAÇÃO)



Madson Ralide Fonseca Gomes <mrfg2004@globo.com>

[RBFAR] Editor Decision

1 mensagem

Sistema SciELO de Publicação <suporte.aplicacao@scielo.org> 16 de outubro de 2012 15:19
Responder a: "Dr. A. Elizabeth Linder" <linder.ufsc@gmail.com>
Para: Madson Ralide Fonseca Gomes <mrfg2004@globo.com>
Cc: Ana Laura Bemvenuti Jacques <analaurabj@gmail.com>, Roselena Silvestri Schuh <rose_schuh@yahoo.com.br>

Dear Dr Fonseca Gomes:

We have reached a decision regarding your submission to "RBFAR-1629 - Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* L. and *Drimys brasiliensis* Miers."

We would like to compliment you as the manuscript has been accepted for publication in Brazilian Journal of Pharmacognosy. Technical revision may be pending.

Your contribution has now been assigned to the Technical Editors and you will be contacted with their queries and you will receive the galley proofs later.

If you have any queries, please do not hesitate to contact me.

Thank you for submitting your work to our Journal.

With kind regards,

Dr. A. Elizabeth Linder
Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC, Florianópolis, SC
linder.ufsc@gmail.com

Revista Brasileira de Farmacognosia
revista@sbfgnosia.org.br
Tel. FAX + 55 41 3360 4062
<http://submission.scielo.br/index.php/rbfar>

ANEXO C – RFAR-1540 (ACEITE PARA PUBLICAÇÃO)



Madson Ralide Fonseca Gomes <mrfg2004@globo.com>

[RBFAR] Editor Decision

4 mensagens

Sistema SciELO de Publicação <suporte.aplicacao@scielo.org> 24 de setembro de 2012 11:49
Responder a: "Dr. A. Elizabeth Linder" <linder.ufsc@gmail.com>
Para: Madson Ralide Fonseca Gomes <mrfg2004@globo.com>
Cc: Roselena Silvestri Schuh <rose_schuh@yahoo.com.br>, Ana Laura Bemvenuti Jacques <analaurabj@gmail.com>

Dear Dr Fonseca Gomes:

We have reached a decision regarding your submission to "RBFAR-1540 - Anti-tumoral activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* L. and *Drimys brasiliensis* Miers on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines in vitro".

We would like to compliment you as the manuscript has been accepted for publication in Brazilian Journal of Pharmacognosy. However, be aware that the Editor in Chief may ask you to provide few changes before publication in order to better fit the reviewers comments. For example, the authors should consider to cite references of previous studies reporting biological activity for these oils.

Technical revision may be pending.

Your contribution has now been assigned to the Technical Editors and you will be contacted with their queries and you will receive the galley proofs later.

If you have any queries, please do not hesitate to contact me.

Thank you for submitting your work to our Journal.

With kind regards,

Dr. A. Elizabeth Linder
Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC, Florianópolis, SC
linder.ufsc@gmail.com

Revista Brasileira de Farmacognosia
revista@sbfgnosia.org.br
Tel. FAX + 55 41 3360 4062
<http://submission.scielo.br/index.php/rbfar>

ANEXO D – COMITÊ DE ÉTICA DA FEPPS (AVALIAÇÃO)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio do IPB - LACEN, sala 06
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br



AVALIAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

1º PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO nº 09/2009 – CEP - FEPPS/RS

I) IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação da Toxicidade Aguda e subcrônica de óleos voláteis de *Drimys brasiliensis* Miers e *Drimys angustifolia* L. em ratos Wistar”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Eliane Dallegrave¹ – pesquisadora principal

Mirna Bainy Leal³ – pesquisadora colaboradora

Renata Pereira Limberger² – pesquisadora colaboradora

Gilcélia Guadagnin Dorneles² – pesquisadora colaboradora

¹*Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul – CIT/RS*

²*Departamento de Análises – Faculdade de Farmácia – UFRGS*

³*Departamento de Farmacologia – ICBS - UFRGS*

CURRÍCULO LATTES DO PESQUISADOR: Estão cadastrados no Sistema Lattes.

GERENTE OU ORIENTADOR: Eliane Dallegrave – Médica veterinária

INSTITUIÇÃO DE ORIGEM: Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul – CIT/RS.

LOCAL DE EXECUÇÃO: *Departamento de Análises – Faculdade de Farmácia – UFRGS.*

Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS.

ÁREA TEMÁTICA: 2.00 - Ciências Biológicas; 2.14 - Toxicologia.

PATROCINADOR: Faculdade de Farmácia/UFRGS; Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CDCT – FEPPS/SES – RS;

DATA/ENTRADA CEP: 25/08/2009

DATA/APROVAÇÃO CEP: 04/11/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio do IPB - LACEN, sala 06
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

**A) AVALIAÇÃO DOS DOCUMENTOS E DA FOLHA DE ROSTO:**

Guia para encaminhamento de projetos está com preenchimento completo (uso do GPP/(FEPPS));

A folha de rosto não se aplica.

II) CARACTERIZAÇÃO DO TEMA E JUSTIFICATIVA:

Através dos estudos propostos neste projeto, espera-se avaliar a toxicidade sistêmica dos óleos voláteis, de forma que seja possível relacionar efeitos capazes de interferir nos diversos sistemas orgânicos, tais como: hepático, renal, cardíaco e sistema nervoso central.

O perfil de toxicidade sistêmica (aguda e subcrônica) pode dar início à avaliação do potencial de desenvolvimento de um medicamento a partir dos princípios ativos responsáveis pelos efeitos relatados por seu uso popular e estudos realizados anteriormente confrontando-os com os observados nos ensaios biológicos.

Além dos resultados esperados com o estudo das espécies de *Drimys*, a aprovação desta proposta visa dar continuidade à linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo grupo, com o apoio da FEPPS,

III) OBJETIVOS PRINCIPAIS E ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a toxicidade sistêmica aguda e sub-crônica de óleos voláteis de espécies do gênero *Drimys* nativas do Brasil.

1.1 Estudar a toxicidade aguda, incluindo avaliação hepática, renal, cardíaca, pulmonar e sobre o sistema nervoso central, dos óleos voláteis de espécies de *Drimys* em ratos Wistar.

1.2 Avaliar a toxicidade subcrônica, incluindo avaliação hepática, renal, cardíaca, pulmonar e sobre o sistema nervoso central, dos óleos voláteis de espécies de *Drimys* em ratos Wistar.

v) METODOLOGIA:**a) AMOSTRA:**

Serão utilizados 115 ratos Wistar adultos, submetidos ao protocolo da OECD, que preconiza a dose letal mediana.

b) CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO:

Não se aplica

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio do IPB - LACEN, sala 06
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

**c) MÉTODOS ESTATÍSTICOS:**

Há clareza e delimitação do tamanho da amostra, os fatores envolvidos e a metodologia aplicada (ANOVA) quanto a sua adequação aos ensaios comparativos propostos.

d) ADEQUAÇÃO AOS OBJETIVOS:

Detalhar as avaliações bioquímicas nos órgãos eviscerados, pois nos objetivos não constam quais serão essas avaliações e as técnicas que serão utilizadas.

e) FORMA DE DESCARTE E/OU ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA:

Os aspectos de Biossegurança são contemplados por se tratar de um estudo com múltiplas etapas, onde ocorrerão manipulações dos materiais coletados e analisados (extrações de óleos voláteis), além da manipulação e descarte dos ratos utilizados nos ensaios biológicos, oferecendo potenciais riscos aos analistas oriundos ao grau variado de toxidez e dispersão dos agentes no meio ambiente. O Projeto relata a forma de destruição ou inutilização do material e das amostras

VI) EXEQUÍBILIDADE DO PROJETO:**a) ORÇAMENTO:**

O orçamento proposto está centrado no material para utilização no laboratório em adequação a metodologia proposta e os objetivos do Projeto.

b) CRONOGRAMA:

O cronograma enfatiza a execução dos testes de forma exequível e objetiva, embora tenha que sofrer remanejo quanto ao prazo em virtude da data de aprovação do projeto e o cronograma das ações propostas inicialmente.

VII) RELEVÂNCIA DO PROJETO:

Conforme arrolado em sua Introdução e seus Objetivos o Projeto apresenta interesse no **ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS PARA USO MEDICINAL DE ORIGEM FITOTERÁPICA**.

Assim podemos inferir que o referido projeto está dentro das metas de desenvolvimento e Pesquisa da FEPPS, buscando avanços científicos, necessitando esclarecimentos quanto as metodologias, as quais serão empregadas na avaliação sérica.

VIII) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Não se aplica.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio do IPB - LACEN, sala 06
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

**IX) COMENTÁRIOS DOS RELATORES:**

Somos favoráveis à aprovação deste projeto por se tratar de um tema que alia o conhecimento popular com a potencialidade do uso científico para fins medicinais dos princípios ativos destas plantas abundantes na nossa região, de fácil manipulação e aproveitamento, frente aos resultados compatíveis com os relatos e estudos continuados.

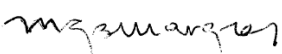
X) PARECER DO CEP/FEPPS:

O Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS apreciou o presente projeto, em reunião do dia 04/11/2009, ata nº 06/2009, e conforme acordado nesta mesma ata que os aspectos pendentes ao serem apresentados pelas pesquisadoras colocariam o projeto na condição de aprovado.

O presente projeto encontra-se ética e metodologicamente adequado.

Reiteramos que relatórios semestrais do projeto em andamento, relatório final e cópia do trabalho de conclusão e/ou publicação deverão ser entregues ao Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS

Porto Alegre, 4 de novembro de 2009.


Maria da Graça Boucinha Marques
Coordenadora CEP-FEPPS/RS