

## EFEITOS TÓXICOS DE $\alpha$ E $\beta$ -ASARONAS E DO ÓLEO DE CÁLAMO EM CAMUNDONGOS, EMBRIÕES DE GALINHA E MUTAGENICIDADE EM *SALMONELLA TYPHIMURIUM* \*

Helena Yuco YABIKU \*\*  
Seizi OGA \*\*\*  
Franco LAJOLO \*\*\*\*  
Heloisa ANDRIGHETTI \*\*\*\*

RIALAG/589

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e do óleo de cálamo em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 45(1/2): 1-12, 1985.

RESUMO: Foram verificadas as DL50 do óleo de cálamo de variedades diferentes, assim como os seus componentes ativos  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas em camundongos, por via intraperitoneal. A DL50 do óleo de cálamo, variedade indiana, foi de 154,5 mg/kg, a da  $\beta$ -asaronas, de 184,0 mg/kg e a da  $\alpha$ -asaronas, de 226,0 mg/kg. Para variedade européia e para o extrato oleoso isento de asaronas, em virtude de suas baixas toxicidades agudas, não foi possível a determinação dos valores de DL50.

O estudo da toxicidade em embriões de galinha para verificar eventual atividade teratogênica foi feito também para os óleos de diferentes variedades, assim como os componentes  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas isolados. A mortalidade média variou de 10,0 a 100,0% e não se constataram sinais de malformação nos embriões desenvolvidos.

O teste de Ames foi conduzido com o componente  $\beta$ -asaronas nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500  $\mu$ g/placa. A amostra não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das concentrações, frente à cepa de *Salmonella typhimurium*, com e sem adição de ativador obtido de extrato de fígado de rato após indução com Aroclor 1254.

DESCRITORES:  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, efeitos tóxicos em camundongos e em embriões de galinha;  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium*; óleo de cálamo, efeitos tóxicos em camundongos e em embriões de galinha; óleo de cálamo, atividade mutagênica em *S. typhimurium*.

### INTRODUÇÃO

O *Acorus calamus*, conhecido no Brasil como cálamo, é uma planta encontrada em zonas temperadas e, segundo CAVAZZA<sup>2</sup>, ela pode ser classificada em 4 citotipos correspondentes às variedades norte-americana (diplóide), européia (triplóide), indiana Jammu (tetraplóide) e Kashmir (hexaplóide).

Desde a antigüidade, as raízes e os rizomas do cálamo têm sido usados para o tratamento de várias doenças, sendo bastante conhecidos os seus usos como espasmolítico, normotensor e também como inseticida<sup>6</sup>.

As propriedades biológicas do cálamo, variedade tetraplóide, são atribuídas à presença da  $\beta$ -asaronas (isômero cis) que chega a constituir, nas variedades indianas, cerca de 80%

\* Realizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\*\* Do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

\*\*\*\* Do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

do óleo. A  $\alpha$ -asaronas ou isômero *trans* está presente em quantidades menores, cerca de 1% apenas<sup>6</sup>.

Na literatura, verifica-se a existência de muitos dados sobre a DL50 do óleo de cáalamo da variedade indiana, mas há poucas informações sobre a variedade européia. A DL50 do óleo de cáalamo, variedade européia, por via intraperitoneal, em ratos, foi relatado recentemente por YABIKU et alii<sup>10</sup>. Por outro lado, os valores de DL50 da  $\alpha$ -asaronas isolada, que aparecem na literatura, são conflitantes; no INDEX MERCK<sup>11</sup>, é citada como dose letal 50% para  $\alpha$ -asaronas, administrada intraperitonealmente em cobaias, o valor de 275 mg/kg, enquanto não se verifica nenhum dado de DL50 para  $\beta$ -asaronas. Esses valores, porém, foram obtidos para o óleo e não para  $\alpha$ -asaronas, nos estudos toxicológicos realizados por CHOPRA et alii<sup>3</sup>, a que o Index Merck se refere.

SHARMA & DANDIYA<sup>14</sup> foram os únicos a informar os valores de DL50 para  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas isoladas, que variaram de 300 a 122 mg/kg, respectivamente, em ratos, por administração intraperitoneal.

Diante da constatação do aparecimento de tumores malignos no intestino delgado e outras alterações em ratos tratados com o óleo indiano, adicionado na ração em concentrações de 500, 1.000, 2.500 e 5.000 ppm, o uso de cáalamo foi completamente banido nos Estados Unidos<sup>16</sup>. Em estudos realizados por Habermann (informação pessoal), essa carcinogenicidade do óleo de cáalamo foi atribuída à presença de  $\beta$ -asaronas, a qual, segundo esse autor, seria capaz de provocar o aparecimento de tumores malignos no intestino delgado dos ratos<sup>9</sup>.

Graças às suas propriedades organolépticas, o óleo de cáalamo é atualmente usado em larga escala nas indústrias de bebidas e perfumarias, e níveis de até 30 ppm desse óleo podem ser encontrados em *bitters*, licores e vermutes<sup>18</sup>.

O controle de óleo de cáalamo, mais especificamente da  $\beta$ -asaronas, foi feito por nós em 56 amostras de bebidas alcoólicas, do tipo amargo, consumidas no Brasil, verificando-se que apenas uma delas tinha teores acima do permitido, que é de 1 ppm, estabelecido pelo Conselho da Europa<sup>4</sup>.

Dando continuidade a estudos anteriores, um dos objetivos do trabalho foi o de determinar a DL50 de óleos de cáalamo das variedades indiana e européia, paralelamente com a de seus principais componentes isolados,  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, para sanar dúvidas com relação às suas toxicidades. Também foi estudada a toxicidade do extrato oleoso isento de asaronas.

Em complementação aos estudos realizados por diversos autores determinaram-se, ainda neste trabalho, a toxicidade em embriões de galinha, dos óleos e seus componentes, para verificar sua eventual atividade teratogênica.

Esses ensaios foram planejados em função de resultados conflitantes encontrados na literatura. Além disso, foram feitos ensaios com teste de Ames para detecção eventual da atividade mutagênica desses compostos.

Segundo GOGGELMANN & SCHIMMER<sup>8</sup>, a  $\beta$ -asaronas é mutagênica pelo teste de Ames, enquanto que HSIA et alii<sup>10</sup> relataram pelo mesmo teste a não existência de atividade mutagênica, mesmo em concentrações de 2 a 200  $\mu$ g/placa, estando o assunto a merecer um esclarecimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Os padrões de óleo de cáalamo, variedade européia, foram fornecidos pela "Firmenich & Cia. Ltda." e o de variedade indiana pelo "Food and Drug Administration", dos EUA. Os componentes isolados  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas foram adquiridos, respectivamente, da "Sigma Chemical Co." e da "Fritzsche Dodge & Olcott Inc."

### Preparo do extrato oleoso isento de $\alpha$ e $\beta$ -asaronas

Preparou-se uma coluna cromatográfica de 2x15 cm de alumina. Inicialmente a coluna foi umedecida com éter de petróleo (30 a 60°C) retirando-se eventuais bolhas de ar e, em seguida, procedeu-se à eluição do óleo de cáalamo puro, variedade européia, com o próprio éter, utilizando-se um volume final de 350 ml. O éter eluiu praticamente todos os componentes do óleo, como também parte das asaronas; por isso, foi necessário reeluir o extrato obtido, passando numa nova coluna de alumina, repetindo-se por três vezes essa operação, para eliminação total desses compostos.

O extrato etéreo isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, além de mais dois componentes que são eluídos após as frações de asaronas, possivelmente sesquiterpênicos, foi concentrado em banho-maria à temperatura de 40 a 60°C, com auxílio de corrente de nitrogênio.

O controle da presença de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas residuais no extrato foi feito através de cromatografia em fase gasosa, como já descrito no trabalho anterior<sup>19</sup>.

### Métodos

#### Toxicidade aguda em camundongos

Utilizaram-se, para determinação de DL50, 260 camundongos de ambos os sexos, com peso médio de 30 g.

Em todos os experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas para adaptação, com ração e água *ad libitum* até 12 horas antes da experiência. A partir de então, suspendeu-se a ração e foi-lhes dado somente água.

Os animais, em grupos de 10, foram separados e as drogas administradas intraperitonealmente em doses variáveis de 100,0 a 337,5 mg/kg no caso do óleo de cálamo, variedade indiana Jammu, e de 150,0 a 1139,1 mg/kg para o óleo de cálamo, variedade européia, assim como nos ensaios com o óleo isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas.

A dose de  $\alpha$ -asarona variou de 100,0 a 759,4 mg/kg, enquanto a da  $\beta$ -asarona, de 100,0 a 337,5 mg/kg. Todas as drogas foram injetadas em solução de óleo de soja com volume final de 0,2 ml/camundongo, sendo, em seguida, os camundongos observados por 24 horas, quanto ao seu comportamento e letalidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Toxicidade aguda em camundongos

A tabela 1 apresenta os dados relativos aos grupos de animais tratados com o óleo de cálamo, variedade indiana, por via intraperitoneal.

Conforme mostra a tabela, a administração de 225,0 mg/kg de óleo acarretou a morte da quase totalidade dos animais, que atingiu a 100% com a administração da dose de 337,5 mg/kg, dentro do período de 24 horas de observação.

Os animais dos grupos III e IV, correspondentes às doses de 225,0 e 337,5 mg/kg, logo após a administração das drogas mostraram depressão seguida de convulsão, vindo a falecer logo em seguida.

A DL50 do óleo de cálamo indiano em camundongos, por via intraperitoneal, foi de  $154,5 \pm 1,1$  mg/kg (tabela 1). Quanto ao óleo de cálamo, variedade européia, e ao extrato oleoso isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas (tabelas 2 e 3, respectivamente), em virtude de suas baixas toxicidades agudas, não foi possível a determinação dos valores de DL50.

Conforme a tabela 2, a injeção de até 337,5 mg/kg da droga não provocou a morte em nenhum dos animais, que chegou apenas a 20% para as doses elevadas de 506,3 e 1139,1 mg/kg.

TABELA 1

Determinação de DL50 do óleo de cálamo, variedade indiana, por via intraperitoneal, em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	3 h	4 h	
I	100,0	0	0	1	0	10
III	150,0	0	3	0	0	30
II	225,0	0	7	2	0	90
IV	337,5	3	7	—	—	100

DL50 =  $154,5 \pm 1,1$  mg/kg.

TABELA 2

Determinação de DL50 do óleo de cálamo, variedade européia, por via i.p., em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	150,0	0	0	0	0	0
II	225,0	0	0	0	0	0
III	337,5	0	0	0	0	0
IV	506,3	0	1	0	1	20
V	759,4	0	0	0	1	10
VI	1139,1	0	0	1	1	20

*Toxicidade em embriões de galinha*

Utilizaram-se 600 ovos de galinha "Garrinson", com dimensões relativamente uniformes, escolhidos ao acaso, de suprimento comercial.

Os ovos foram colocados em incubadora elétrica e, após 96 horas, foram submetidos ao exame ovoscópico. Do total foram rejeitados 106 ovos, correspondentes a 17,67%, por apresentarem embriões não desenvolvidos ou em precárias condições de desenvolvimento, tendo sido utilizados, efetivamente, 494 ovos.

A inoculação foi feita segundo o esquema de OGA<sup>13</sup>, no 8.º dia. A experiência foi conduzida em duas etapas e, em todos os ovos, foi injetado um volume constante de 0,2 ml de solução no saco vitelino, variando apenas as concentrações das drogas administradas. As doses variaram de 0,15 a 15 mg/kg para os três óleos utilizados, a variedade indiana Jammu, a européia e o óleo isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas. Para os componentes  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, as doses variaram de 0,04 a 4,00 mg/kg. Em todos os experimentos, constituiu-se um grupo-controle que recebeu somente o óleo de soja em volume de 0,2 ml/ovo.

As etapas seguintes seguiram o mesmo procedimento usado por YABIKU et alii<sup>19</sup>.

*Teste de Ames*<sup>1</sup>

Foram utilizadas cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 e TA 1535, com e sem adição da fração S<sub>0</sub> (extrato de fígado de rato, induzido por Aroclor 1254).

As concentrações de  $\beta$ -asarona utilizadas foram de 10, 50, 100, 200 e 500  $\mu$ g/placa. Todas as diluições foram feitas com DMSO (dimetilsulfóxido) e as contagens foram realizadas após 72 horas de incubação a 35°C.

*Métodos estatísticos*

Valemo-nos, neste trabalho, dos seguintes tipos de testes:

*Método de probito*, segundo técnica de MILLER & TAINTER<sup>12</sup> para determinação da DL 50

*Análise de variância*, de acordo com o método recomendado por GRANER<sup>9</sup> para determinação de atividade teratogênica. Nos casos em que a variável era representada em valores percentuais, estes foram transformados em arco-senso; quando a análise de variância mostrou valor significativo, complementou-se então com o teste de contraste entre médias de Tukey<sup>15</sup>.

Usou-se, em todos os cálculos, o nível crítico para rejeição de hipótese de nulidade, igual ou menor que 0,1 (10%). Para caracterizar os valores estatisticamente significantes usou-se um asterisco.

Em relação aos animais tratados com o extrato oleoso, a morte atingiu, como era esperado, apenas um máximo de 10% (tabela 3). Este extrato oleoso, obtido através da cromatografia em coluna a partir de óleo de cálammo europeu, estava isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e, ainda, de dois compostos sesquiterpênicos que não conseguimos reter na coluna. Pelo valor de DL 50 observado para o extrato oleoso, de qualquer forma a toxicidade destes dois compostos parece ser relativamente baixa.

Os valores de DL 50 para o óleo de cálammo citados por diferentes autores apresentam sensível variação (tabela 4). Tal variação parece ser dependente principalmente da via de administração e da espécie animal utilizadas<sup>3, 5, 6, 16</sup>.

TABELA 3

*Determinação de DL50 do óleo de cálammo, variedade européia, isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, por via intraperitoneal, em camundongos*

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	150,0	0	1	0	0	10
II	225,0	0	0	0	0	0
III	337,5	0	1	0	0	10
IV	506,3	0	0	0	0	0
V	759,4	0	0	0	0	0
VI	1139,1	0	0	0	0	0

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e do óleo de cáalamo em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

TABELA 4

Valores de DL50 do óleo de cáalamo obtidos por diferentes autores

Espécie animal	Via de administração	Variedade de óleo de cáalamo	DL50 (mg/kg)	Referência
cobaias	i.p.	indiana	275	3
camundongos	i.p.	indiana	177	5
ratos	i.p.	indiana	221	4
ratos	p.o.	indiana	777	15
ratos	i.p.	européia	299	18
camundongos	i.p.	indiana	155	presente trabalho
camundongos	i.p.	européia	>1139	presente trabalho
camundongos	i.p.	européia, isenta de asaronas	>1709	presente trabalho

i.p. = intraperitoneal.

p.o. = via oral.

O óleo de cáalamo da variedade indiana, administrado por via intraperitoneal, exhibe toxicidade cerca de três vezes maior do que a provocada por via oral, fato, aliás, compreensível, um vez que a absorção de qualquer substância através da cavidade intraperitoneal é rápida<sup>18</sup>.

Quanto à espécie animal, segundo dados obtidos por DANDIYA et alii<sup>5</sup>, DANDIYA & CULLUMBINE<sup>6</sup> e CHOPRA et alii<sup>3</sup>, os camundongos parecem ser mais sensíveis do que os ratos e cobaias.

O valor de DL 50 obtido no presente trabalho para o óleo de cáalamo variedade indiana é ligeiramente menor em relação aos relatados por DANDIYA et alii<sup>5</sup> e CHOPRA et alii<sup>3</sup>. Esta diferença pode ser atribuída a fatores pertinentes ao próprio sistema biológico ou ao teor dos princípios ativos contidos no óleo. Dentre os princípios ativos que as plantas do gênero *Acorus* encerram,  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas são tidas como as principais responsáveis pela toxicidade do óleo essencial. Por exemplo, a concentração de  $\beta$ -asaronas no óleo oscila desde traços na variedade americana ou diplóide até cerca de 80% na variedade indiana Jammu ou tetraplóide (tabela 5).

TABELA 5

Teor de óleo essencial e de  $\beta$ -asaronas em diferentes variedades do óleo de cáalamo, segundo CAVAZZA<sup>2</sup>

Variedade	Óleo essencial no rizoma seco (%)	$\beta$ -asaronas no óleo essencial (%)
americana (diplóide)	2,17	traços
européia (triplóide)	1,50-4,80	2,50-9,50
indiana Jammu (tetraplóide)	5,00-6,82	77,12-82,00
Kashmir (hexaplóide)	1,40	4,60

A diferença entre o valor encontrado na nossa experiência e o citado por CHOPRA et alii<sup>3</sup> é certamente devida ao fator espécie animal, ao passo que pequena diferença verificada em relação ao valor citado por DANDIYA & CULLUMBINE<sup>6</sup> é atribuível à variação da concentração de  $\beta$ -asarona nas amostras estudadas. A propósito, a nossa amostra continha 92,8% de  $\beta$ -asarona.

As tabelas 6 e 7 mostram, respectivamente, os dados relativos aos animais tratados com  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas isoladas. A administração de  $\alpha$ -asarona na dose de 759,4 mg/kg levou à morte dos 100% dos animais. A DL 50 foi de  $225,5 \pm 1,1$  mg/kg intraperitoneal em camundongos.

Como mostra a tabela 7, a letalidade 100% foi causada com a dose de 337,5 mg/kg de  $\beta$ -asarona, de modo semelhante ao ocorrido com os animais dos grupos III e IV tratados com  $\beta$ -asarona, que mostraram depressão

seguida de convulsão vindo a falecer em pouco tempo. A DL50 da  $\beta$ -asarona foi de  $184,2 \pm 1,0$  mg/kg administrados intraperitonealmente em camundongos.

Assim, os valores da DL50 de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas mostram ser de toxicidades relativamente altas, sendo o valor para  $\alpha$ -asarona sensivelmente maior do que o da  $\beta$ -asarona e ambos semelhantes ao do óleo.

Os valores de DL50 das  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas reportados na literatura, bem como os obtidos no presente trabalho, são mostrados na tabela 8.

A DL50 de  $\alpha$ -asarona, 275 mg/kg, constante de INDEX MERCK<sup>11</sup>, apesar de estar próxima da encontrada por SHARMA & DANDIYA<sup>14</sup> e da obtida no presente trabalho, parece na verdade ser a DL 50 do óleo de cálammo e não da  $\alpha$ -asarona; o Index Merck não faz menção da fonte bibliográfica daquela informação.

TABELA 6

*Determinação da LD50 da  $\alpha$ -asarona, intraperitonealmente, em camundongos*

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	100,0	0	0	1	0	10
II	150,0	0	0	0	3	0
III	225,0	0	1	1	0	20
IV	337,5	0	0	0	9	90
V	506,3	0	0	0	8	80
VI	759,4	0	0	0	10	100

DL 50 =  $225,5 \pm 1,1$  mg/kg.

TABELA 7

*Determinação da DL50 da  $\beta$ -asarona, intraperitonealmente, em camundongos*

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	100,0	0	0	0	0	0
II	150,0	0	0	1	0	10
III	225,0	3	5	1	0	90
IV	337,5	4	6	—	—	100

DL 50 =  $184,2 \pm 1,0$  mg/kg.

TABELA 8

Valores da DL50 de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas em diferentes experimentos

Drogas	Espécie animal	Via de administração	DL50 (mg/kg)	Referências
$\alpha$ -asarona	ratos	i.p.	300	13
$\alpha$ -asarona	cobaias	i.p.	275	11, 16
$\alpha$ -asarona	camundongos	i.p.	226	presente trabalho
$\beta$ -asarona	ratos	i.p.	122	13
$\beta$ -asarona	camundongos	i.p.	184	presente trabalho

i.p. = intraperitoneal.

Comparando os dados da DL 50 encontrados para  $\beta$ -asarona e para óleo de cálamu, variedade indiana, a toxicidade relativamente maior encontrada para o óleo pode ser explicada em termos de sinergismo com algum outro componente presente.

*Toxicidade em embriões de galinha. Atividade teratogênica*

No que concerne à embriotoxicidade, não há nenhum dado na literatura que se refira a experiências ou comprove a existência de atividade teratogênica no óleo de cálamu, tendo o assunto já sido revisto por nós em trabalhos anteriores<sup>13</sup>, quando referimos a não existência de embriotoxicidade do óleo integral da variedade européia.

Neste trabalho, o estudo da toxicidade em embriões de galinha foi realizado a fim de

verificar eventual atividade teratogênica efetuada para os seguintes componentes: óleos de cálamu da variedade indiana e européia, extrato oleoso isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e os componentes  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas independentemente.

O estudo foi realizado em 2 etapas: a primeira experiência foi feita com os óleos de variedades diferentes e com o extrato oleoso isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas, enquanto que, na outra, testaram-se os  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas separadamente.

Na primeira experiência, o desenvolvimento dos embriões, no grupo controle, foi da ordem de 86%, enquanto que o dos embriões tratados com o extrato oleoso isento de asaronas, em doses variáveis de 0,15 a 15,0 mg/ovo, foi sensivelmente menor (tabela 9).

TABELA 9

*Letalidade em embriões de galinha inoculados com óleos de cálamu, variedades indiana, européia e extrato oleoso isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas*

Grupos	Doses (mg/ovo)	Embriões inoculados	Embriões mortos	Letalidade média (Porcentagem $\pm$ desvio padrão)
Controle		28	4	14,2 $\pm$ 1,4
Óleo de Cálamu, variedade indiana	0,15	28	28	100,0 $\pm$ 0,0
	1,50	28	28	100,0 $\pm$ 0,0
	15,00	28	28	100,0 $\pm$ 0,0
Óleo de Cálamu, variedade européia	0,15	28	24	86,7 $\pm$ 5,8
	1,50	28	24	85,8 $\pm$ 1,4
	15,00	28	28	100,0 $\pm$ 0,0
Extrato oleoso isento de $\alpha$ e $\beta$ asaronas	0,15	28	3	10,0 $\pm$ 0,0
	1,50	28	6	21,7 $\pm$ 3,5
	15,00	28	9	32,5 $\pm$ 4,3

Já os embriões tratados com o óleo de cálammo, tanto da variedade européia quanto da indiana, mostraram percentagem elevada de letalidade. Os embriões tratados com o óleo de cálammo europeu, nas doses de 0,15 e 1,5 mg/ovo, mostraram letalidade praticamente igual, enquanto que na dose de 15,0 mg/ovo, a letalidade atingiu a 100%.

A mortalidade igual a 100% foi observada nos embriões tratados com o óleo de cálammo indiano, desde a dose de 0,15 mg/ovo até 15,0 mg/ovo. Embora se reconheça a importância de se verificar a letalidade dos embriões com doses menores dessa amostra, em virtude do objetivo deste trabalho, que era apenas verificar eventual teratogenia, tal experiência não foi realizada.

A avaliação estatística dos dados foi feita pelo método de análise de variância, onde se utilizaram "índices de letalidade", calculados pela relação entre a percentagem de letalidade causada pela droga em questão e a percentagem de letalidade do grupo controle (tabela 10). Por essa análise verificamos que é insig-

nificante a variação dos índices de letalidade em função das doses aplicadas, porém é significativa em função das drogas. O teste de contraste entre médias de Tukey revela que há diferença significativa entre diversos tratamentos a que foram submetidos os embriões de galinha. Assim entre os tratados com a variedade européia e com o extrato oleoso, bem como entre os tratados com a variedade indiana e com o extrato oleoso, ocorrem diferenças significativas; já entre os tratados com as variedades indiana e européia, a diferença não foi significativa.

Na segunda experiência, onde se estudou a ação de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas isoladas, o desenvolvimento dos embriões no grupo controle foi da mesma ordem daquele obtido na experiência anterior.

A letalidade dos embriões tratados com  $\alpha$ -asarona diferiu apenas sensivelmente entre as doses administradas de 0,04 a 4,00 mg/ovo. O mesmo não ocorreu com os embriões tratados com  $\beta$ -asarona nessas mesmas doses,

TABELA 10

*Índice de letalidade em embriões de galinha inoculados com óleo de cálammo, variedade indiana, européia e extrato oleoso isento de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas*

(*Continua*)

Drogas Doses (mg/kg)	Óleo de Cálammo		Extrato oleoso isento de $\alpha$ e $\beta$ -asaronas
	Variedade indiana	Variedade européia	
0,15	4,1	3,1	0,8
1,50	4,1	3,1	1,3
15,00	4,1	4,1	1,6

*Análise de variância dos índices de letalidade da tabela 10*

Fonte de Variação	$\phi$	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Entre drogas	2	1350,2	675,1	64,7 *
Entre doses	2	57,6	28,8	2,8
Resíduo	4	41,8	10,4	—
Total	8	1449,6	—	—

\* Significativo  $P \leq 0,1$ .

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e do óleo de cálammo em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

Análise de variância da tabela 10

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Entre grupos	2	1350,2	675,1	40,7 *
Resto	6	99,4	16,6	—
Total	8	1449,6	—	—

\* Significativo  $P \leq 0,1$ .

Teste de contraste entre médias de Tukey

(conclusão)

Tratamentos	$\bar{X}$	$\bar{X}_I - \bar{X}_R$	$\bar{X}_E - \bar{X}_{EXT.}$
Variedade indiana	41,0	—	—
Variedade européia	34,3	6,7	—
Extrato oleoso isento de asaronas	12,3	28,7*	22,0*

\* Significativo  $P \leq 0,1$ .

$$Q_{cal.} = \frac{\sqrt{Q_{MR}}}{\sqrt{n_i}} = \frac{\sqrt{16,6}}{\sqrt{3}} = 2,35$$

$$T = Q_{cal.} \times Q_{critico}$$

$$T = 2,35 \times 4,34$$

$$T = 10,2$$

enquanto que, com a administração de  $\beta$ -asarona na dose de 0,04 mg/ovo, cerca de 43% dos embriões apresentaram evolução normal até os últimos dias de incubação; com doses de 0,4 e 4,00 mg/ovo, a morte atingiu quase a totalidade dos embriões tratados (tabela 11).

A análise de variância efetuada sobre os índices de letalidade em embriões de galinha inoculados com  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas demonstrou ser insignificante a variação em função das drogas ou das doses utilizadas (tabela 12).

Nas duas experiências realizadas para verificar a eventual atividade teratogênica, não se constatou nenhum caso de malformação entre os sobreviventes.

O estudo da atividade teratogênica permite concluir que o óleo de cálammo de diferentes variedades, assim como as  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas são incapazes de produzir efeito teratogênico em embriões de galinha. A mesma conclusão não é inteiramente extensível ao ser humano, porém é um indício bastante favorável da ausência de atividade teratogênica.

TABELA 11

Valores percentuais de letalidade dos embriões-controle e dos inoculados com  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas

Grupos	Doses (mg/ovo)	Embriões inoculados	Embriões mortos	Letalidade média (%) $\pm$ D.P.
Controle	Óleo de soja	30	4	13,3 $\pm$ 5,8
$\alpha$ -asarona	0,04	30	15	50,0 $\pm$ 0,0
	0,40	30	16	53,3 $\pm$ 5,8
	4,00	30	18	60,0 $\pm$ 0,0
$\beta$ -asarona	0,04	30	17	56,7 $\pm$ 5,8
	0,40	29	26	89,7 $\pm$ 0,6
	4,00	30	30	100,0 $\pm$ 0,0

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e do óleo de cálcio em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

TABELA 12

*Índice de letalidade em embriões de galinha inoculados com  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas*

Doses (mg/ovo)	Drogas	$\alpha$ -asarona	$\beta$ -asarona
	0,04		2,1
0,40		2,2	3,3
4,00		2,4	4,2

*Análise de variância dos índices de letalidade da tabela 12*

Fonte de Variação	$\phi$	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Entre drogas	1	160,2	160,2	5,0
Entre doses	2	121,0	60,5	1,9
Resíduo	2	64,3	32,2	—
Total	5	345,5	—	—

$P \leq 0,1$

TABELA 13

*Média de resultados de três ensaios para cada concentração*

$\beta$ -asarona ( $\mu\text{g/placa}$ )	Média do número de colônias revertentes por placa											
	TA 98						TA 100					
	Sem $S_0$			Com $S_0$			Sem $S_0$			Com $S_0$		
	C	T	MR	C	T	MR	C	T	MR	C	T	MR
10	31	34	1,08	36	30	0,88	187	192	1,01	218	163	1,13
50	35	56	1,60	47	32	0,85	204	219	1,07	157	195	1,24
100	35	63	1,61	47	57	1,21	204	205	1,01	177	222	1,41
200	31	42	1,23	36	38	1,10	187	151	0,79	153	192	1,26
500	31	31	0,92	44	36	0,86	204	235	1,56	153	185	1,19

C = Controle T = Teste

MR = Razão de Mutagenicidade

Amostra positiva MR  $\geq 2,0$

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e do óleo de cálamo em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

TABELA 14

Média de resultados de três ensaios para cada concentração

$\beta$ -asarona ( $\mu\text{g/placa}$ )	Média do número de colônias revertentes por placa					
	TA 1535					
	Sem $S_0$			Com $S_0$		
	C	T	MR	C	T	MR
10	100	91	1,15	37	40	1,17
50	145	138	0,47	48	60	1,32
100	145	127	0,90	48	55	1,17
200	100	99	1,57	37	37	1,09
500	100	98	0,91	37	38	0,89

C = Controle T = Teste

MR = Razão de Mutagenicidade

Amostra positiva  $\geq$  2,0

#### Teste de Ames — atividade mutagênica

Os resultados dos ensaios realizados em triplicata, com a  $\beta$ -asarona nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{g/placa}$  são mostrados nas tabelas 13 e 14; somente em concentração de 500 $\mu\text{g/placa}$  e superiores, a  $\beta$ -asarona mostrou toxicidade positiva, enquanto que para as outras concentrações foram negativas.

Na razão de mutagenicidade (MR) de todas as concentrações, em todos os ensaios, nenhuma apresentou resultado maior ou igual a 2,0, levando a concluir que a  $\beta$ -asarona não apresenta atividade mutagênica. Este resultado

confirma os achados de HSIA et alii<sup>10</sup> mas não os de GOGGELMANN & SCHIMMER<sup>9</sup>. Uma das explicações pode ser a diferença do indutor usado para a obtenção do sistema enzimático microsomal de rato ou  $S_0$  que, no nosso caso, foi o Aroclor 1254 e, no desse autor, Clophen A50. Este assunto merece novos estudos.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Petra Sanches, da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), pela orientação nos ensaios de mutagenicidade.

RIALA6/589

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Toxicity of  $\alpha$  and  $\beta$ -asarone, and calamus oil for mice, chick embryos, and mutagenicity for *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

ABSTRACT: The LD50 was 154.5 mg per kg of mice injected intraperitoneally with calamus oil obtained from the Indian variety, while oil from the European variety had unmeasurable toxicity. The LD<sub>50</sub> was 184.0 mg/kg for  $\beta$ -asarone and 226.0 mg/kg for  $\alpha$ -asarone. There was no teratogenic activity in chick embryos injected with either calamus oil (Indian or European variety) or  $\alpha$ -asarone, or  $\beta$ -asarone. Mean mortality varied from 10 to 100%. Ames test showed no mutagenic activity when  $\beta$ -asarone was added, at concentrations of 10, 50, 100, 200 or 500 mcg to plates growing *Salmonella typhimurium*. The activator factor present in liver extracts from rats after induction with Aroclor 1254 did not influence the lack of mutagenicity.

DESCRIPTORS:  $\alpha$  and  $\beta$ -asarone, toxic effect in mice and chick embryos;  $\alpha$  and  $\beta$ -asarone, mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*; calamus oil, toxic effect in mice and chick embryos; calamus oil, mutagenic activity in *S. typhimurium*.

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -asaronas e do óleo de cálamus em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMES, B.N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. — Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31:347-64, 1975.
2. CAVAZZA, G. — Les chimiotypes parmi les plantes aromatiques cas du calamus polyploid. *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 69: 833-44, 1976.
3. CHOPRA, I.C.; KHAJURIA, B.N. & CHOPRA, C.L. — Antibacterial properties of volatile principles from *Alpinia galanga* and *Acorus calamus*. *Antibiot. Chemother.*, 7:378-83, 1957.
4. COUNCIL OF EUROPE — *Natural flavouring substances, their sources, and added artificial flavouring substances*. Strasburg, 1974. p. 34.
5. DANDIYA, P.C.; BAXTER, R.M.; WALKER, G.C. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus*, part II: investigation of volatile oil. *J. Pharm. Pharmacol.*, 11:163-8, 1959.
6. DANDIYA, P.C. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus*. III. Some pharmacological actions of the volatile oil. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 125:353-9, 1959.
7. ESTADOS UNIDOS. National Institute for Occupational Safety and Health. *Registry of toxic effects of chemical substances*. [s.l.] 1977. v. 2, p. 166.
8. GOGGELMANN, W. & SCHIMMER, O. — Mutagenicity testing of B-asarone and commercial calamus drugs with *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 121:191-4, 1983.
9. GRANER, E.A. — *Estatística*. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Melhoramentos, 1966. p. 92-3.
10. HSIA, M.R.S.; ADAMOVICS, J.A. & KREAMER, B.L. — Microbiological mutagenicity studies of insect growth regulators and other potential insecticidal compounds in *Salmonella typhimurium*. *Chemosphere*, 8:521-9, 1979, apud *Chem. Abstr.*, 91: 187657p, 1979.
11. The MERCK index: an encyclopedia of chemicals and drugs. 9<sup>th</sup>ed. Rahway, N.J., Merck Co., 1976. p. 110.
12. MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. — Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 57:261-4, 1944.
13. OGA, S. — Atividade teratogênica dos cloretos de samário e gadolínico em embrião de galinha. *Rev. Fac. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 7:259-84, 1969.
14. SHARMA, J.D. & DANDIYA, P.C. — Studies on *Acorus calamus*. VI. Pharmacological actions of asarone and  $\beta$ -asarone on cardiovascular system and smooth muscles. *Indian J. med. Res.*, 50:61-5, 1962.
15. SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. — *Biochemistry*. San Francisco, W.H. Freeman, 1969. 776 p.
16. TAYLOR, J.M.; JONES, W.I.; HAGAN, E.C.; GROSS, M.A.; DAVIS, D.A. & COOK, E.L. — Toxicity of oil of calamus (Jammu variety). *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 10: 405, 1967.
17. WOJTOWICZ, E.J. — Spectrofluorometric determination of  $\beta$ -asarone in sweet and dry vermouths. *J. agric. Food Chem.*, 24: 526-8, 1976.
18. YABIKU, H.Y.; OGA, S. & LAJOLO, F.M. — Efeitos tóxicos do óleo de *Acorus calamus*. Estudo preliminar em ratos e embriões de galinha. *An. Farm. Quím. São Paulo*, 19: 252-8, 1979.
19. YABIKU, H.Y. & LAJOLO, F. — Determinação de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:135-45, 1980.

Recebido para publicação em 4 de junho de 1984.