

Análise do potencial mutagênico do extrato etanólico de *Zingiber officinale* pelo teste do micronúcleo

Breno Bezerra Martinsⁱ

Judson Barroso da Silvaⁱⁱ

Millena Carine Oliveira Carvalho dos Santosⁱⁱⁱ

Priscila Karine Coelho Campos^{iv}

Antonio Luiz Martins Maia Filho^v

Samylla Miranda Monte^{vi}

Rosemarie Brandim Marques^{vii}

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol12ed1.421>

Resumo

O *Z. officinale* é utilizado como condimento e erva medicinal desde a antiguidade, há mais de 3.000 anos, tendo sido usada para o tratamento de náuseas, dispepsias, vômito, diarreia e reumatismo. Apesar do uso corriqueiro de pela medicina popular, o gengibre não possui estudos acerca de sua genotoxicidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico do *Z. officinale* por meio do teste do micronúcleo. O estudo foi realizado com 25 camundongos fêmeas, divididos igualmente em cinco grupos. No grupo controle negativo, foi administrada a solução de água destilada aos animais. No grupo controle positivo, foi administrada ciclofosfamida (100 mg/kg). Nos grupos de tratamentos I, II e III, os camundongos receberam respectivamente 1.000mg/kg, 3.000mg/kg e 5.000mg/kg de extrato etanólico de *Z. officinale*. A genotoxicidade foi avaliada por meio da presença de micronúcleos em 2000 eritrócitos normocromados em sangue periférico. Os dados avaliados mostraram que o extrato etanólico de *Z. officinale* não possui atividade genotóxica.

Palavras-chaves: Gengibre; Genotoxicidade; Teste do micronúcleo.

Analysis of the mutagenic potential of the ethanolic extract of *Zingiber officinale* by the micronucleus test

Abstract

The *Z. officinale* has been used as a condiment and medicinal herb since ancient times, more than 3,000 years ago, and it has been used for the treatment of nausea, dyspepsia, vomiting, diarrhea and rheumatism. Despite the common usage of folk medicine, there are no studies on the genotoxicity of ginger. The present study aimed to evaluate the genotoxic potential of *Z. officinale* by means of the micronucleus test. The study was performed with 25 female mice, equally divided into five groups. In the negative control group, the distilled water solution was administered to the animals. In the positive control group, cyclophosphamide (100 mg / kg) was given. In the treatment groups I, II and III, the mice received respectively 1,000mg / kg,

3,000mg / kg and 5,000mg / kg of ethanolic extract of *Z. officinale*. Genotoxicity was assessed by the presence of micronuclei in 2000 normochromatic erythrocytes in peripheral blood. The evaluated data showed that the ethanolic extract of *Z. officinale* has no genotoxic activity.

Keywords: Ginger; Genotoxicity; Micronucleus test.

Recebido em 14/12/2018 Aceito em 20/02/2019

1 INTRODUÇÃO

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a Organização Mundial da Saúde estima que 70% a 95% da população dependem de terapias tradicionais, dentre elas o uso de plantas medicinais, na atenção básica de saúde (GONÇALVES, 2013). A *Zingiber officinale* é uma erva com rizoma horizontal de cor amarela esverdeada, popularmente conhecida como gengibre, utilizado como condimento e erva medicinal desde a antiguidade (DABAGUE, 2011; NAGENDRA CHARI et al., 2013). Utilizada popularmente para o tratamento de náuseas, dispepsias, vômito, diarreia e reumatismo (PALHARIN et al., 2008; SHAREEF et al., 2016).

Várias pesquisas demonstram que substâncias presentes no gengibre tem efeito benéfico na diminuição da sintomatologia de distúrbios inflamatórios crônicos, como artrite reumatoide e colite ulcerosa, além dos efeitos anti-inflamatórios (AL-TAHTAWY et al., 2011), antioxidante (PENG et al., 2012; RAHMAN et al., 2011; SHANMUGAM et al., 2011), antiprotozoário (DYAB et al., 2016) e antiviral (NAGENDRA CHARI et al., 2013). Adicionalmente, o *Z. officinale* faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS, 2018).

O Teste do Micronúcleo (TM) tem sido utilizado para avaliar o potencial carcinogênico de compostos em estudos de toxicidade (BALMUS et al., 2015), na triagem de genotoxicidade de muitas classes de produtos químicos farmacêuticos, produtos agrícolas, aditivos alimentares, entre outros (HAYASHI, 2016). Além disso, o TM é usado para detecção de danos cromossômicos causados por fatores ambientais e de estilo de vida, bem como por exposições ocupacionais e certas doenças (NERSESYAN et al., 2014).

Dado o exposto, faz-se necessário estudo do potencial mutagênico do *Z. officinale* por meio de testes de avaliação mutagênica, como o Teste do Micronúcleo.

2 METODOLOGIA

As amostras de *Z. officinale* foram adquiridas na forma em pó no comércio do Centro de Teresina-PI. Foram pesados 100 g de pó de *Z. officinale* foram submetidos à extração até esgotamento utilizando etanol absoluto e rotaevaporado a 60°C, para obtenção do extrato etanólico, que foi mantido em temperatura ambiente até o momento da análise. O rendimento foi de 5,764 g.

Foram utilizados 25 camundongos (fêmeas) da espécie *Mus musculus*, com 12 semanas de vida, com peso médio de 28 g, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBIO) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina - PI, com uso devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESPI sob protocolo de número 0215/2018. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, água e comida serão oferecidas *ad libitum*.

Os animais foram divididos em cinco grupos (cinco camundongos por grupo). No grupo controle negativo, foi administrada a solução de água destilada aos animais. No grupo controle positivo, foi administrada ciclofosfamida (100 mg/kg). Nos grupos de tratamentos I, II e III, os camundongos receberam respectivamente 1.000 mg/kg, 3.000 mg/kg e 5.000 mg/kg de extrato etanólico de *Z. officinale*. As concentrações de extrato estabelecidas estão de acordo com estudos prévios (PLENGSURIYAKARN et al., 2012). A administração de ciclofosfamida (0,1 mL da solução/10 g de peso corpóreo) foi realizada via intraperitoneal no grupo controle positivo. Nos demais grupos, a administração foi feita por gavagem (0,1 mL da solução/10 g de peso corpóreo).

As lâminas de esfregaço foram confeccionadas a partir do sangue periférico da cauda dos animais, coletados após 48h e 72h da administração do tratamento em todos os grupos. As lâminas foram secas, fixadas em metanol absoluto, coradas com Giemsa e lavadas com água destilada. Para avaliação da presença de micronúcleos (MN), foram avaliados 2000 eritrócitos de cada animal após 48h e novamente após 72h. A análise foi feita em microscópio óptico (aumento de 1000x).

Os dados coletados foram analisados utilizando-se o GraphPadPrism™ versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), para a comparação das médias dos grupos controle e tratados,

utilizando ainda a análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Tukey, com nível de significância de 5% (NASCIMENTO et al., 2016).

3 RESULTADOS

O Teste do Micronúcleo foi feito seguindo o protocolo da OECD e as recomendações presentes em Custer et al. 2016. Os resultados obtidos através da análise microscópica das lâminas de esfregaço provenientes dos grupos estão sintetizados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Média de MN em 2000 eritrócitos normocromáticos após exposição aguda (48h)

Camundongo	Grupo CP	Grupo CN	Grupo T1	Grupo T2	Grupo T3
C1	38	7	3	2	5
C2	25	4	4	2	2
C3	25	3	3	3	2
C4	30	2	3	3	4
C5	32	3	3	4	2
Média e Desvio Padrão	30 ±4,86	3,8 ±1,72	3,2 ±0,4	2,8 ±0,75	3 ±1,26

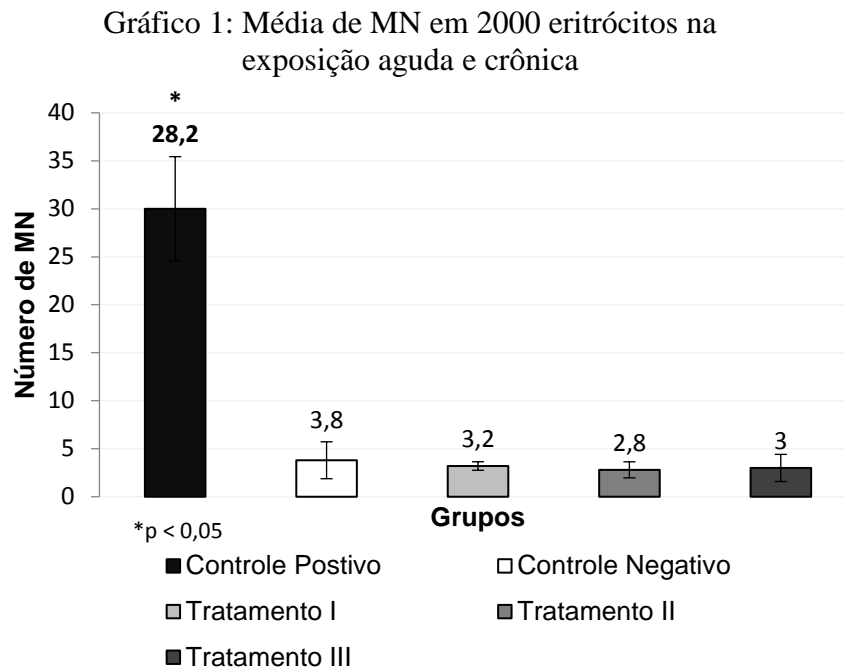
Legenda: CP(controle positivo); CN (controle negativo); Grupo T1 (1000mg/kg); Grupo T2 (3000 mg/kg); Grupo T3 (5000 mg/kg).

Tabela 2: Média de MN em 2000 eritrócitos normocromáticos após exposição crônica (72h).

Camundongo	Grupo CP	Grupo CN	Grupo T1	Grupo T2	Grupo T3
C1	15	6	4	2	4
C2	23	4	4	4	3
C3	25	2	2	6	6
C4	35	2	7	5	4
C5	34	4	2	1	0
Média ± DP	26,4 ±8,29	3,6 ±1,49	3,8 ±1,83	3,6 ±1,85	3,4 ±1,96

Legenda: CP(controle positivo); CN (controle negativo); Grupo T1 (1000mg/kg); Grupo T2 (3000 g/kg); Grupo T3 (5000 mg/kg).

Após análise estatística, foram obtidos os resultados presentes no gráfico 1, evidenciando diferença estatística relevante ($p < 0,05$) entre os grupos controle negativo, tratamentos I, II e III em comparação ao grupo controle positivo pelo teste ANOVA.



4 DISCUSSÃO

A partir do presente estudo, percebe-se que o extrato etanólico de *Z. officinale* não possui atividade mutagênica identificável pelo teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, uma vez que as amostras de tratamento apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo, mas não ao controle negativo. Esse resultado está de acordo com outros estudos presentes na literatura que observaram propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias (FUNK et al., 2016) e antioxidantes (EVERTON et al., 2019) de substâncias presentes no *Z. officinale* (MARMITT et al., 2015).

Possivelmente, os efeitos do gengibre sobre o câncer se deve à sua atividade antioxidante, indução de apoptose e alteração de expressões gênicas. Sendo estas atividades contribuintes para a diminuição do tumor. Isto está relacionado à presença de substâncias como o canfeno, p-cineol, o alfapterol e outros compostos fenólicos extraídos do óleo do gengibre (TOHMA et al., 2017).

Rodrigues e Lira (2013) realizaram um estudo fitoquímico do óleo do gengibre e os resultados obtidos são compatíveis com os listados na literatura, apresentando substâncias como d-canfeno, felandreno, zingibereno, cineol, citral, borneal, gingerol e sesquiterpenos, além de açúcares, proteínas, vitaminas do complexo B e vitamina C (9).

Estudos anteriores demonstraram, inclusive, capacidade de genoproteção do gengibre, protegendo o DNA de danos à radiação (RAO et al., 2011). Também já foi relatada a capacidade anti-inflamatória do gengibre, que se deve à sua capacidade de inibir as enzimas cicloxigenase, tendo três vezes mais afinidade para inibir a COX-2 do que a COX-1, fator importante para permitir efeito anti-inflamatório sem efeitos adversos na mucosa gastrointestinal e na atividade plaquetária (BREEMEN et al., 2011).

Além disso, outros estudos mostram que compostos presentes no *Z. officinale* possuem propriedades anticancerígenas, mostrando a diminuição de fator nuclear kappa- β (NF- κ β) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a inibição da angiogênese (PARK et al, 2014; HABIB et al, 2008). Esses efeitos anticarcinogênicos do gengibre também já foram demonstrados por diversos trabalhos, mostrando a capacidade de um de seus produtos, o 6-gingerol, em suprimir células tumorais e de alterar o fluxo sanguíneo para o tumor (CHENG, 2011). Os resultados no presente estudo constituem mais uma evidência que aponta para atividade não-mutagênica do *Z. officinale*.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os dados da literatura a respeito dos efeitos antioxidante e anticarcinogênico apresentados pelo gengibre, seja o óleo ou outros extratos a partir desta planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Tahtawy RHM, El-BastawesyAM, Monem MGA, Zekry ZK, Al-Mehdar HA, El-Merzabani MM. Antioxidant activity of the volatile oils of *Zingiber officinale* (ginger). **Spatula DD**. v. 1, n. 1, p. 1-8, 2011.
- BALBINO, Evelin E.; DIAS, Murilo F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.
- BALMUS, G. et al. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability

- screening in mice. **Nature Protocols**, v. 10, p. 205-215, 2015.
- BREEMEN, R.B. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*). **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 38-43, 2011.
- CHENG X.L. et al. Steamed ginger (*Zingiber officinale*): changed chemical profile and increased anticancer potential. **Food Chem.** v. 129, n. 4, p. 1785-92, 2011.
- CUSTER, L. et al. The *In vivo* Rodent Micronucleus Assay. In: PROUDLOCK, Ray. Genetic Toxicology Testing: A Laboratory Manual. **Elsevier Science Publishing Company Incorporated**, p. 269-322, 2016.
- DABAGUE, I. C. M. et al. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 13, n. 1, p. 79-84, 2011.
- DYAB, A.K. et al. Anti-giardial therapeutic potential of dichloromethane extracts of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* *in vitro* and *in vivo*. **Parasitol Res**, 115, 2637, 2016.
- EVERTON, G.O.; TELES, A.M.; MOUCHREK, A.N.; MOUCHREK FILHO, V.E.; CUTRIM, E.S.M. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoolicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Revista Virtual de Química**, In Express, 2019.
- FERREIRA, S. G. **Estudos do efeito da melatonina sobre danos ao DNA induzidos pela ciclofosfamida em ratos Wistar pinealectomizados**. Universidade de São Paulo, 2008.
- FUNK, J.L.; FRYEA, J.B.; OYARZOA, J.N.; CHENA, J.; ZHANGB, H.; TIMMERMANNB, B.N. Anti-inflammatory effects of the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in experimental rheumatoid arthritis. **PharmaNutrition**, 4, 123–131, 2016.
- GONÇALVES, Tavares et al. Políticas de salud para la fitoterapia en Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 632-637, 2013.
- GOVINDARAGHAVAN, Suresh; SUCHER, Nikolaus J. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and prerequisites for consistent safety and efficacy of herbal medicines. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, p. 363-371, 2015.
- HABIBI, S.H. et al. Ginger extract (*Zingiber officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats. **Clinics**, v. 63, n. 6, p. 807-813, 2008.
- HAYASHI, M. The micronucleus test: most widely used *in vivo* genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, p. 18, 2016.
- MARMITT, D.J et al. Análise sistemática da produção científica do *Zingiber officinale* roscoe após a criação da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao sistema único de saúde. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 22, n. 4, p. 14-21, 2015.
- NAGENDRA CHARI K.L.; MANASA D.; SRINIVAS P.; SOWBHAGYA H.B. Enzymeassisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food Chemistry**, v. 15 n. 139(1-4), p. 509-514, 2013.
- NASCIMENTO, W.M. et al. Genotoxicity of Goji Berry (*Lyciumbarbarum*) *In Vivo* Mammalian Cells. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 5, n. 4, p. 23-26, 2016.
- NERSESYAN, A. et al. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): A review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk, **Mutation Research**, v. 762, p. 37-51, 2014.
- PALHARIN, L.H.; Di Creddo et al. Estudo sobre gengibre na medicina popular. **Revista Científica**, 2008.
- PARK, G.H. et al. Anticancer activity of Ginger (*Zingiber officinale*) leaf through the expression of activating transcription factor 3 in human colorectal cancer cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 208, 2014.

- PENG F, et al. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 568-85, 2012.
- PLENGSURIYAKARN, T et al. Anticancer activities against cholangiocarcinoma, toxicity and pharmacological activities of thai medicinal plants in animal models. **BMC Complement Altern Med**. v. 12, n.23,2012.
- RAHMAN S, SALEHIN F, IQBAL A. In vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. **BMC Complement Altern Med**, v. 20, n. 11, p. 76, 2011.
- RAO B.N.; ARCHANA P.R.; AITHAL B.K.; RAO B.S.. Protective effect of zingerone, a dietary compound against radiation induced genetic damage and apoptosis in human lymphocytes. **Eur J Pharmacol**. v. 657, n. 1-3, p. 59-66, 2011.
- RENISUS. **Ministério da Saúde**. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-aosus-renisus>>. Acesso em: 08 jul. 2018.
- RODRIGUES, M.L.; LIRA, R.K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). SaBios: **Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.1, p.44-52, jan./abr., 2013.

- SHANMUGAM KR, MALLIKARJUNA K, NISHANTH K, KUO CH, REDDY KS. Protective effect of dietary ginger on antioxidante enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues. **Food Chem**, v. 124, n. 4, p. 1436-42, 2011.
- SHAREEF, HASANAIN KHALEEL et al. Antibacterial effect of ginger (*Zingiber officinale*) roscoe and bioactive chemical analysis using gas chromatography mass spectrum. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 20-40, 2016.
- TOHMA, H.; GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; GÖREN, A.C.; ALWASEL, S.H.; KÖKSAL, E. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. **Food Measure**, 11:556–566, 2017.

ⁱ Graduando do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas (FACIME) da Universidade Estadual do Piauí.

ⁱⁱ Graduando do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas (FACIME) da Universidade Estadual do Piauí.

ⁱⁱⁱ Graduanda do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas (FACIME) da Universidade Estadual do Piauí.

^{iv} Graduanda do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas (FACIME) da Universidade Estadual do Piauí.

^v Docente da Universidade Estadual do Piauí.

^{vi} Docente da Universidade Estadual do Piauí.

^{vii} Docente da Universidade Estadual do Piauí. E-mail para contato: rosebmarques@hotmail.com