



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CAMILA MARTINS GÜEZ

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DO MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOBRE PARÂMETROS
OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E GENOTOXICOLÓGICOS EM
CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiana, RS, Brasil.

2014

CAMILA MARTINS GÜEZ

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DO MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOBRE PARÂMETROS
OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E GENOTOXICOLÓGICOS EM
CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Michel Mansur Machado
Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

Uruguaiiana

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

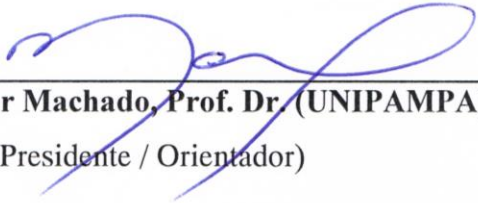
**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS,
INFLAMATÓRIOS E GENOTOXICOLÓGICOS EM CULTURA DE
LEUCÓCITOS HUMANOS**

elaborada por

Camila Martins Güz

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas


COMISSÃO EXAMINADORA:



Michel Mansur Machado, Prof. Dr. (UNIPAMPA)
(Presidente / Orientador)



Jacqueline Escobar da Costa Piccoli, Profª. Drª. (UNIPAMPA)



Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Profª. Drª. (UFSM)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, por sempre depositarem confiança e terem proporcionado os melhores alicerces na construção do meu futuro, minha mãe e meu eterno pai com seus ensinamentos que jamais serão levados ou esquecidos.

Aos queridos orientadores, Michel Mansur Machado e Luís Flávio Souza de Oliveira, pelo profissionalismo, ensinamentos constantes e disponibilidade para resolver qualquer problema relacionado ao trabalho, além da amizade que construímos ao passar desse tempo. Serei sempre grata pelo apoio fornecido e saibam que tenho vocês como grandes exemplos.

Aos colegas do laboratório NUBIOTOXIM, que se tornaram amigos e parceiros. Obrigada por surgirem no meu caminho com palavras de apoio, ideias, muita ajuda e colaboração no desenvolvimento do trabalho. Com certeza a parcela de vocês para a realização deste, foi fundamental e de grande importância.

À Universidade Federal de Santa Maria, e ao Laboratório de Química Farmacêutica, Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde e sua doutoranda Aline Augusti Boligon, pela disponibilidade e ajuda na realização de parte dos testes.

Aos professores da banca, pela disponibilidade em fazer a leitura do trabalho de dissertação do mestrado.

A todos que de alguma maneira ou outra ajudaram na elaboração e execução deste trabalho.

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E GENOTOXICOLÓGICOS EM CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS

A utilização de produtos naturais na medicina popular como recurso terapêutico é uma tendência generalizada pela população brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não só de produtos naturais, como também de medicamentos fitoterápicos. Neste contexto, o Manjericão (*Ocimum basilicum* L.) surge como um destes recursos terapêuticos, sendo amplamente utilizado como planta ornamental e como condimento. Originário da Ásia tropical, hoje é cultivado no mundo todo. Entre os usos populares do *O. basilicum* L., está o emprego como antioxidante, anti-inflamatório, anti-cancerígeno, antimicrobiano, agente cardiovascular, fatores associados ao envelhecimento, dentre outros. Diversos metabólitos secundários com atividade antioxidante e anti-inflamatória já foram identificados nesta espécie e trabalhos relatam que o Ácido Rosmarínico é o composto biologicamente mais ativo. Sabendo da importância econômica e da enorme difusão mundial de seus usos, tanto na culinária, quanto na medicina popular, torna-se importante a comprovação dos efeitos do Manjericão, visando garantir sua eficácia e sua segurança, já que estudos de toxicidade para esta espécie são raros e usualmente não abordam aspectos genéticos. Este trabalho, portanto, teve como objetivo a avaliação da atividade antioxidante pelo teste da peroxidação lipídica, conteúdo de proteína carbonilada, vitamina C; atividade das enzimas *Superóxido dismutase* (SOD) e *Catalase* (CAT); análise dos parâmetros inflamatórios pela avaliação de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, e a toxicidade genética do extrato hidroalcoólico frente a leucócitos humanos em cultura celular, através da viabilidade e proliferação celular, ensaio cometa, teste de micronúcleo e instabilidade cromossômica. Observou-se que o extrato etanólico de *O. basilicum* agiu como agente antioxidante reduzindo/revertendo os efeitos causados pelo peróxido de hidrogênio, ações essas que podem ser explicadas pela composição rica em polifenóis e flavonoides do extrato, além de seu conteúdo de ácido rosmarínico, um importante antioxidante com atividade comprovada e descrita na literatura. Em relação aos parâmetros genotoxicológicos, para todos os testes, os resultados foram dose-dependentes. Enquanto que para os parâmetros inflamatórios, o extrato apresentou capacidade anti-inflamatória, onde o possível mecanismo envolvido ocorre pela interação de inibição das citocinas mediadoras pró-inflamatórias e o estímulo de citocinas mediadoras anti-inflamatórias.

Palavras chave: Radicais Livres, manjericão, anti-inflamatória, estresse oxidativo, genotoxicologia.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF BASIL (*Ocimum basilicum* L.) ON OXIDATIVE, INFLAMMATORY AND GENOTOXIC PARAMETERS IN HUMAN CULTURE LEUKOCYTE

The use of natural products in folk medicine as a treatment method is a general trend for the Brazilian population. This trend has contributed significantly to the consumption not only of natural products, as well as herbal medicines. In this context, Basil (*Ocimum basilicum* L.) arises as one of these therapeutical resources. Basil is widely used as an ornamental plant and as a condiment. Original in tropical Asia, is now grown worldwide. Among the popular uses of *Ocimum basilicum* L., its employment as an antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-microbial, cardiovascular agent, factors associated with aging, between others. Several secondary metabolites with antioxidant and anti-inflammatory activity have been identified in this species and several studies have reported that rosmarinic acid is the most biologically active compound. Knowing the economic importance and worldwide dissemination of their uses, both in cooking, as in folk medicine, it is important to prove the effects of Basil, to ensure its efficacy and safety, as toxicity studies for this species are rare and usually do not approach genetic aspects. This study evaluated the antioxidant activity by testing lipid peroxidation, protein carbonyl content, vitamin C; activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT); analysis of inflammatory parameters for the evaluation of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines, and genetic toxicity of the hydroalcoholic extract in human white blood cells (WBC) using cell culture, through the analysis of cell viability and cellular proliferation, chromosome instability, comet assay and micronucleus test. With our results it is possible to verify that *O. basilicum* extract acts as an antioxidant and effectively reverts or subjugates the effects of a high oxidizing agent as hydrogen peroxide and, these actions are explained because its composition, which is rich in polyphenols and flavonoids besides several compound as Rosmarinic Acid, who have a well-known antioxidant activity. In toxicological tests, all results were dose-dependent. In the anti-inflammatory aspect, we show that our extract actually presents these properties and the mechanism involved in these particular actions are a composed interaction between the inhibition of pro-inflammatory mediator and the stimulation of anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Free radicals, basil, anti-inflammatory, oxidative stress, genotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
PARTE I	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
Figura 01 - Folha de Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i> , variedade Genovese)	14
Figura 02 - Compostos que definem os quimiotipos do Manjerição	15
PARTE II - MANUSCRITO	19
RESULTS AND DISCUSSION	28
Figure 01 - Dose-effect curve using the crude extract of <i>Ocimum basilicum</i> in different doses (0.0001 mg/mL to 100 mg/mL) to determine the lethal dose 50 (LD ₅₀) in human leukocytes.	29
Figure 02 - Effects of <i>Ocimum basilicum</i> extract in oxidative parameters of human leukocytes in culture subject to hydrogen peroxide.	30
Figure 03 - Effects of <i>Ocimum basilicum</i> extract in anti-genotoxic parameters of human leukocytes in culture exposed to hydrogen peroxide.	33
Figure 04 - Effects of <i>Ocimum basilicum</i> extract in inflammatory parameters of human leukocytes in culture exposed to dextran solution.	35

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 01 - Concentrations of some biologically important groups and compounds presents in <i>Ocimum basilicum</i> L extract.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

μM - Micromolar
ANOVA - Análise de variância
AR – Ácido Rosmarínico
BHT - Butil-hidroxitolueno
CAT – Catalase
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CN – Controle negativo
COX - Ciclooxigenase
CP – Controle positivo
DAD - Detector de arranjo de fotodiodos
DI – Índice de dano
DL – Dose letal
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EROs - Espécies reativas de oxigênio
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
IL – Interleucina
LD – Dose letal (Lethal dose)
mA - Miliamperes
MDA – Malondialdeído
mM – Milimolar
MN – Micronúcleo
NC – Controle negativo
nMol - Nanomolar
NO - Óxido nítrico
ObE – Extrato de *Ocimum basilicum*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PC – Controle positivo
RL's – Radicais Livres
ROS – Reactive Species of Oxygen
SOD - Superóxido dismutase
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF – α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	Página
PARTE I	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Manjeriço	13
2.2 Compostos isolados do Manjeriço	15
2.3 Atividades biológicas do Manjeriço	16
2.4 Toxicidade do Manjeriço	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.1 Específicos	18
PARTE II	19
4 MANUSCRITO	19
PARTE III	44
5 DISCUSSÃO GERAL	44
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

APRESENTAÇÃO

A dissertação divide-se em três partes principais.

Parte I: Encontram-se INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e OBJETIVOS.

Parte II: Encontram-se os resultados que estão apresentados sob a forma de manuscrito, descritos no item MANUSCRITO. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Parte III: Encontram-se os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO. E as REFERÊNCIAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica, discussão e conclusão desta dissertação.

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais na medicina popular como recurso terapêutico é amplamente difundido na população brasileira, e esta inclinação tem contribuído significativamente para o consumo não só de produtos naturais, como também de medicamentos fitoterápicos. Um recente trabalho da Organização Mundial da Saúde (OMS) que avaliou o uso da medicinal tradicional em diferentes regiões, mostra que o uso de plantas e seus derivados podem alcançar mais de 90% de determinadas regiões do mundo, como China e Malásia (WHO, 2012).

A medicina natural é um recurso terapêutico muito utilizado na automedicação entretanto, devido à facilidade do acesso, pode agravar seus riscos potenciais de toxicidade. Além disso, há uma grande lacuna, relacionada ao entendimento popular, que deve ser preenchida através de ações que busquem melhorar a difusão do conhecimento sobre o uso seguro e racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, entre elas, a disponibilização de informações com comprovação científica, as quais devem ser transmitidas aos médicos, farmacêuticos e aos usuários destes produtos (FARNSWORTH et al., 1985).

Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, altamente reativas que agem como eletrófilos (GILLHAN et al., 1997). As reações dos radicais com o organismo resultam em danos celulares e teciduais que contribuem no surgimento de patologias. Os radicais livres agem nos componentes celulares oxidando lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e glicídios (CHOI et al., 2002).

Neste contexto, o Manjerição (*Ocimum basilicum* L.) surge como alternativa de tratamento, além de ser amplamente utilizado como planta ornamental e como condimento alimentar. Esta espécie pertence à família Lamiaceae e é originário da Ásia tropical, porém hoje é cultivado no mundo todo (SHIGA, et al., 2009). Entre os usos populares o *Ocimum basilicum* é utilizado como agente antioxidante, anti-inflamatório, anti-cancerígeno, antimicrobiano, agente cardiovascular (SAKR & AL-AMOUDI, 2012), no desconforto abdominal causado pela cólica, além de seu uso em problemas

respiratórios, como tosse e asma (HUSSIEN, TESHALE & MOHAMMED, 2011) e como antiagregante plaquetário (BRAVO, et al., 2008).

Diversos metabólitos secundários com atividade antioxidante e anti-inflamatória já foram identificados nesta espécie, sendo os principais: os polifenóis, flavonoides e terpenos (LEE & SCAGEL, 2009). Diversos trabalhos relatam que entre os componentes desta planta, o Ácido Rosmarínico (RA) é o composto biologicamente mais ativo (SHIGA, et al., 2009; LEE & SCAGEL, 2009; JAVANMARDI, et al., 2002).

Sabendo da importância econômica e da enorme difusão mundial de seus usos, tanto na culinária, quanto na medicina popular, torna-se importante comprovar os efeitos farmacológicos e toxicológicos do Manjeriço, visando sua eficácia e aumentar a sua segurança, já que estudos de toxicidade para esta espécie são raros e usualmente não abordam aspectos genéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Manjericão

O Manjericão é uma planta herbácea, aromática e medicinal, conhecida desde a antiguidade pelos indianos, gregos, egípcios e romanos. Ele é envolto de cultura espiritual e simbolismos, sendo, inclusive, considerado sagrado entre alguns povos hindus, por representar *Tulasi*, esposa do deus *Vishnu*. Está relacionado com sentimentos de ódio, amor e luto, mas com certeza é mais amplamente conhecido pelos seus poderes culinários (AKHTAR & MUNIR, 1989).

O manjericão apresenta caule ereto e ramificado, e atinge cerca de um metro de altura. Suas folhas são delicadas, ovaladas, pubescentes e de cor verde-brilhante (**Figura 01**). As inflorescências são do tipo espiga e compostas por flores brancas, lilases ou avermelhadas. Sua polinização é cruzada e os frutos são do tipo aquênio, de coloração preto-azulada. Ocorre mais de 60 variedades diferentes de manjericão, com variações na cor, tamanho e forma das folhas, porte da planta e concentração de aroma. As folhas do manjericão apresentam sabor e aroma doce e picante característico. Elas são utilizadas secas ou frescas na preparação de diversos pratos quentes ou frios, e estão intimamente relacionadas à gastronomia italiana (KÉITA, et al., 2001).



Figura 01: Folha de Manjericão (*Ocimum basilicum*, variedade Genovese).

(Imagem disponível em <http://www.veggieconquest.com/?s=basil>, acesso em 20/11/2012).

2.2 Compostos isolados no Manjericão

Inúmeros trabalhos têm tentado estabelecer um padrão de composição para o manjericão, tanto no extrato, quanto no óleo. A maior dificuldade é a diversidade desta espécie. Hoje, são conhecidos mais de 25 tipos diferentes de *Ocimum basilicum*, com inúmeras diferenças constitucionais (LIBER, et al., 2011; LEE, et al., 2005).

Devido à grande variedade de compostos presentes e da variabilidade de concentrações encontradas neste cultivar, foram estabelecidos quatro quimiotipos, baseados no composto em maior concentração no óleo extraído do Manjericão; são eles: *Quimiotipo Linalol*, *Quimiotipo Estragol*, *Quimiotipo Eugenol* e *Quimiotipo Metileugenol* (LIBER, et al., 2011).

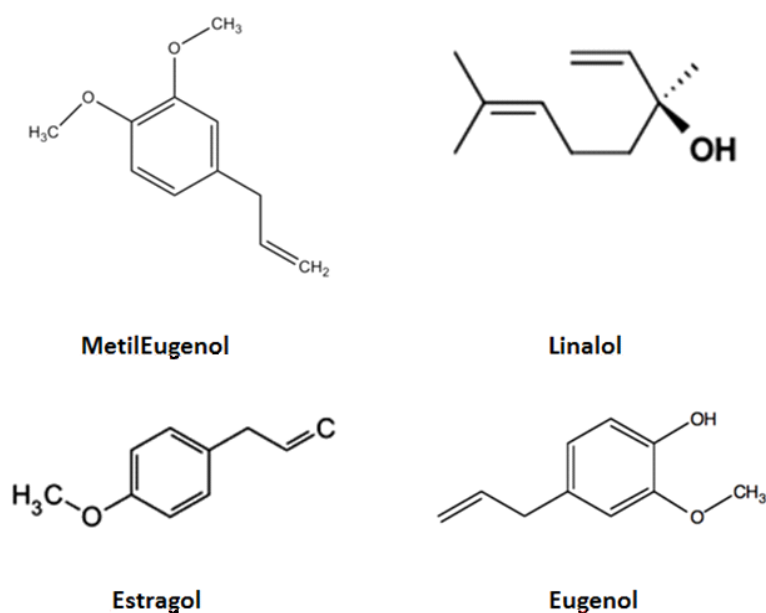


Figura 02: Compostos que definem os Quimiotipos do Manjericão.

Entre os principais compostos isolados até o momento no óleo encontram-se os compostos: Linalol, Metileugenol, Eugenol, Metilcinamato, Chavicol, 1,8-Cineol, α -Terpinol (KÉITA, et al, 1999; LEE, et al., 2005; PASCUAL-VILLALOBOS &

BALLESTA-ACOSTA; 2003), Canfora, Limoneno, Geraniol e Farmaseno (LABRA, et al., 2004).

Já no extrato, os compostos identificados até o momento, foram: Novadensina, Salvigenina, Circiseol, Eupatorin, Gardenina B (GRAYER, et al., 1996), Ácido Chicórico, Ácido Caftárico (LEE & SCAGEL, 2009; KWEE & NIEMEYER, 2011), Ácido-p-Cumárico, Peonidina-3,5-Diglicosídeo (PHIPPEN & SIMON, 1998) e o Ácido Rosmarínico (GRAYER, et al., 1996; LEE & SCAGEL, 2009; SHIGA, et al., 2009; JAVANMARDI, et al., 2002; NGUYEN & NIEMEYER, 2008).

2.3 Atividade biológica do Manjericão

O Manjericão tem sido escolha para uma vasta gama de testes biológicos, usualmente em animais e modelos experimentais *in vitro*. Entre os que apresentaram atividades mais relacionadas ao proposto neste trabalho, destacam-se alguns:

Sakr & Al-Amoudi (2012) relatam que após administração de 20 mL/kg de extrato aquoso de manjericão em ratos albinos durante seis semanas aumentaram as atividades da *Superóxido dismutase* (SOD) e da *catalase* (CAT), além de reduzirem a peroxidação lipídica causada pela administração de deltrametrina. Ainda sobre a atividade antioxidante, Thirugnanasampandan & Jayakumar (2011) avaliaram os efeitos do extrato etanólico de *Ocimum basilicum*, nas concentrações de 50 a 350 µg/mL em cultura de células hepáticas humanas e observaram uma redução na produção de óxido nítrico, com efeitos dose-dependente. Berić e colaboradores, em 2008, demonstraram que o óleo essencial de Manjericão, Quimiotipo Linalol, mostrou-se eficaz para proteger cepas de *Salmonella* dos efeitos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Duraisamy e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos do extrato etanólico *in vitro* em parâmetros inflamatórios. Os resultados mostraram que o extrato foi capaz de reduzir a atividade das lipooxigenases *in vitro*. Mueller, Hobiger & Jungbauer (2010) avaliaram os efeitos do extrato aquoso de *O. basilicum* a 0,5 mg/mL em cultura de macrófagos. Os resultados mostraram uma redução de 57% na concentração de Interleucina 6, 24% de redução no Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), 19% de redução na atividade da ciclooxigenase 2 (COX-2) e um aumento de 54% na concentração de Interleucina 10 (IL-10). Já um trabalho publicado em 2009 por Rakha e

colaboradores demonstrou que o extrato das sementes de manjeriço reduziu o edema de pata induzida por carragenina em 10%, mostrando, assim, atividade anti-inflamatória.

2.4 Toxicidade do Manjeriço

Apesar da ampla utilização desta espécie na culinária e dos diversos usos populares, estudos envolvendo toxicidade são raros para esta espécie.

Entre os estudos publicados nos últimos anos, envolvendo animais, temos o trabalho de Shiga e colaboradores (2009) que utilizaram ratos machos e avaliaram doses entre 4000 e 6000 mg/kg. Neste trabalho nenhuma morte ou sinal de toxicidade foi registrado. Já Fandohan e colaboradores em 2008 determinaram que o óleo de *O. basilicum* apresentava toxicidade em ratos após administração por 14 dias de doses de 1500mg/kg/dia. Com isso foi determinado uma dose letal (DL₅₀) (dose responsável pela morte de 50% dos animais teste) de 3.250 mg/kg.

Já com culturas de célula, a literatura é mais restrita. Bravo e colaboradores (2008) realizaram um trabalho em cultura de células com macrófagos, avaliando apenas a viabilidade celular. Os resultados mostraram que até 60µg/mL (valor máximo testado) não ocorreram alterações neste parâmetro. Koko e colaboradores (2008) avaliando a viabilidade de linfócitos *in vitro* observaram que concentrações de 25 a 100 µg/mL reduziram em torno de 70% a viabilidade celular. Quanto a proliferação, Gomez-Flores e sua equipe (2008) determinaram que o extrato aquoso apresentava atividade linfoproliferativa a partir de 31,25µg/mL e o mesmo acontecia com o extrato metanólico em concentrações a partir de 125µg/mL.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Determinar os efeitos *in vitro* do extrato de *Ocimum basilicum* L. (Manjericão) sobre parâmetros genotoxicológicos, oxidativos e inflamatórios, em cultura de leucócitos humanos.

3.2 Específicos:

- Determinar o perfil fitoquímico do extrato de *Ocimum basilicum* L., quantificando os níveis de polifenóis, flavonoides, níveis de vitamina C, quantificação dos principais princípios ativos conhecidos;
- Determinar os efeitos do extrato de *Ocimum basilicum* L. sobre parâmetros protetores genotoxicológicos em culturas de leucócitos humanos;
- Avaliar os efeitos antioxidantes desta espécie no estresse oxidativo causados pelo peróxido de hidrogênio em cultura de leucócitos humanos;
- Avaliar os efeitos do extrato de *Ocimum basilicum* L. sobre parâmetros inflamatórios em cultura de leucócitos humanos.

PARTE II

4 MANUSCRITO

Evaluation of Basil Extract (*Ocimum basilicum* L.) on Oxidative, Anti-Genotoxic and Anti-Inflammatory Effects in Human Leukocytes Cell Cultures Exposed to Challenging Agents.

Camila Martins Güez, Raul Oliveira de Souza, Paula Fischer, Maria Fernanda de Moura Leão, Aline Augusti Boligon, Margareth Linde Athayde, Luísa Zuravski, Luís Flávio Souza de Oliveira, Michel Mansur Machado.

Submetido a “Basic & Clinic Pharmacology & Toxicology”



2/6/2014

Gmail - manuscript - Submission confirmation



Michel Machado <micmanmac@gmail.com>

manuscript - Submission confirmation

1 mensagem

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology <bcpt@manuscriptmanager.com> 2 de junho de 2014 17:21
Para: michelmachado@unipampa.edu.br

Manuscript title: Evaluation of Basil Extract (Ocimum basilicum L.) on
Oxidative, Anti-Genotoxic and Anti-Inflammatory Effects in Human
Leukocytes Cell Cultures Exposed to Challenging Agents.

Automatic email

The above manuscript has been successfully submitted online. You will
receive a further receipt email directly from the journal's editorial
office when your submission has been checked and your manuscript files
verified.

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

University of Southern Denmark

Winslowparken 19

Odense

DK 5000

Denmark

bcpt@manuscriptmanager.com

Evaluation of Basil Extract (*Ocimum basilicum* L.) on Oxidative, Anti-Genotoxic and Anti-Inflammatory Effects in Human Leukocytes Cell Cultures Exposed to Challenging Agents.

Camila Martins Güzé¹, Raul Oliveira de Souza², Paula Fischer², Maria Fernanda de Moura Leão², Aline Augusti Boligon³, Margareth Linde Athayde³, Luísa Zuravski⁴, Luís Flávio Souza de Oliveira⁴, Michel Mansur Machado^{4*}.

¹ *Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brasil.*

² *Curso de Farmácia, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brasil.*

³ *Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.*

⁴ *Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brasil.*

*Correspondences must be addressed to Prof. Dr. Michel Mansur Machado, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiiana. BR 472, Km 585, Caixa postal 118, Uruguaiiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970. Tel.: 5555 3413-4321.

E-mail address: michelmachado@unipampa.edu.br

Abstract

Ocimum is one of the most important genera of the Lamiaceae family. Several studies about Basil and its popular use reveal many characteristics from the herb, being used as antioxidant, anti-aging, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-microbial, cardiovascular agent, among others. In this paper we evaluated genotoxic, oxidative and anti-inflammatory parameters from the extract of *Ocimum basilicum* in different concentrations, using human leukocytes cultures exposed to challenging agents. With our results it is possible to verify that *O. basilicum* extract acts as an antioxidant and effectively reverts or subjugates the effects of a high oxidizing agent as hydrogen peroxide and, these actions are explained because its composition, which is rich in polyphenols and flavonoids besides several compound as Rosmarinic Acid, who have a well-known antioxidant activity. In the anti-inflammatory aspect, we show that our extract actually presents these properties and the mechanism involved in these particular actions are a composed interaction between the inhibition of pro-inflammatory mediator and the stimulation of anti-inflammatory cytokines. Although pharmacodynamics studies are necessary to evaluate the activities in vivo, our results demonstrated that Basil could act as antioxidant and anti-inflammatory becoming into a possible alternative for medicinal treatment.

Key words: Free radicals, basil, anti-inflammatory, oxidative stress, genotoxicology.

1. Introduction

The free radicals are oxidizing agents, having one or more unpaired electrons in their outer orbital making them highly reactive species that act as electrophiles [1]. The reactions of free radicals with the organism result in cell and tissue damage that contributes to the development of pathologies. The free radicals act on cellular components by oxidizing lipids, proteins, nucleic acids and carbohydrates [2].

The genus *Ocimum* L. includes approximately 150 species, possessing a great variation in plant morphology and biology, essential oil content, and chemical composition [3]. *Ocimum basilicum*, popular known as Basil or Sweet Basil, is a common herb that belongs to Lamiaceae family. Studies have shown many pharmacological effects in several diseases, acting like a potent antioxidant, anti-aging, anticancer, antiviral and antimicrobial properties [4].

Traditionally, Basil has been used as a medicinal and aromatic herb, to add aroma and flavor to food [5] and several secondary metabolites like polyphenols, flavonoids and terpenes, with recognized potential biologic effects that have been identified in this specie [6]. Studies have reported that in the components of the plant, Rosmarinic Acid (RA) is the most biologically active compound present in Basil [6-8]. Researchers also tried to establish a standard of composition for Basil, both in the extract as in oil, but the biggest difficulty is the fact of existing more than 25 different types of *O. basilicum*, with many constitutional differences [9,10].

Knowing about the economic importance and global dissemination of their uses in cooking and folk medicine it is important to investigate the pharmacological and toxicological effects of Basil, in order to ensure its efficacy and safety, since toxicity studies for these species are rare and do not focus on genetic aspects. The main purpose of the present study was to evaluate the oxidative, genotoxic and anti-inflammatory parameters that may be present in the extract from Basil leaves using human leukocytes cells cultures.

2. Material and Methods

2.1 Chemical, apparatus and general procedures: All chemical were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, chlorogenic acid and caffeic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin, rosmarinic acid, and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

2.2 Plant material: The dry leaves of *Ocimum basilicum* L., variety Genovese, were purchased from a local market in Uruguaiana – RS – Brazil (Latitude 29°45'17"; Longitude 57°05'18"). The leaves were triturated and macerated at room temperature in hydroalcoholic solution (30H₂O: 70 Ethanol v/v) at concentration of 20g per 100mL of solvent for a week under daily shaking. The maceration process was repeated for two more weeks to exhaustion of the vegetable material. In the end of three weeks, the filtrates were pooled and evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator in order to remove ethanol and water. The dry extract of *Ocimum basilicum* (ObE) was used in the following tests.

2.3 Phytochemical analysis of ObE: The ObE was analyzed according to Boligon [11], Laghari [12] and Machado [13] using high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of the compounds concentrations: rosmarinic acid, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin, and kaempferol. The analysis of the polyphenols and flavonoids from the ObE were performed through specific colorimetric reactions using Folin Ciocalteu's reagent [14] and aluminum chloride [15], respectively.

2.4 Cytotoxicity curve in leukocytes: Initially, the dose-effect cytotoxicity curve was determined in leukocytes using the ObE dissolved in PBS Buffer pH 7.2 at doses ranging from 0.0001 mg/mL to 100 mg/mL, to determine the lethal dose 50% (LD₅₀).

Human leukocytes cultures were prepared using 0.5 mL of venous blood collected by venipuncture from a male volunteer (survey approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, approval letter Number: 23,081) and immediately transferred to RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% streptomycin / penicillin and phytohemagglutinin according to a previous study described by Santos Montagner [16]. Cells were kept at 37°C for 72 hours. The analyzed parameter was cell proliferation according to Burow [17].

2.5 Leukocytes culture sample preparations: To assess the anti-oxidative status and anti-genotoxic profiles, the leukocyte cultures were divided in six groups. The groups were: a negative control (phosphate buffer pH 7.2); a positive control (hydrogen peroxide 100 µM); a group with rosmarinic acid at the concentration previously found in the plant by the phytochemical analysis; and three groups with different extract concentrations obtained from toxicity studies, i.e., the LD₅₀, LD_{50/10} and LD_{50/100}. Groups with rosmarinic acid and extracts have also received 100 mM H₂O₂ to induce oxidation. To assess the inflammatory parameters the same groups division described above were used, with exception of positive control that has incorporated Ibuprofen 100 µM. Additionally, all groups received dextran 1% to induce inflammatory process, except the negative control. The concentrations were selected to establish effective doses and exhibit low toxicity to leukocytes. All tests were performed in triplicate.

2.6 Evaluation of antioxidants parameters of ObE in human leukocytes cultures: To analyze the oxidative parameters, we used classical techniques as Lipid Peroxidation, Protein Carbonylation, Ascorbic Acid Content, and Superoxide dismutase and Catalase activities. The assays were carried out in triplicate.

2.6.1 Lipid peroxidation: The extent of lipid peroxidation was estimated as the concentration of thiobarbituric acid reactive products (malondialdehyde) according to Ohkawa [18]. The method measures spectrophotometrically the color produced by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA) at 532 nm.

2.6.2 Protein carbonylation: The protocol was performed according to Morabito [19]. In this technique, Carbonyl (CO) groups (aldehydes and ketones) are produced on

protein side chains when they are oxidized, reacting with 2,4-dinitrophenylhydrazine, forming a color complex.

2.6.3 Ascorbic acid content: According to the method of Jacques-Silva [20] the curve of ascorbic acid was taken as a reference and the reference samples were mixed with trichloroacetic acid 13,3% and 2,4-dinitrophenylhydrazine. After incubation period, the samples were measured at 520 nm in spectrophotometer. The extracts were measured using the same procedure.

2.6.4 Catalase activity: Catalase activity was determined from the rate of decomposition of H₂O₂ [21]. One unit of catalase activity was defined as the required activity to degrade one mol of hydrogen peroxide in 60s.

2.6.5 Superoxide dismutase activity: Superoxide dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1) activity was measured spectrophotometrically according to Boveris [22]. The technique is based on the inhibition of the reaction of superoxide anion with epinephrine. The oxidation reaction of epinephrine produces adenocromo that can be detected spectrophotometrically (480 nm). The enzyme activity was determined by measuring the rate of formation of adenocromo. The reaction medium contains glycine-NaOH and epinephrine. An unit of enzyme activity is defined as the amount of enzymes required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50%.

2.7 Evaluation of anti-genotoxic parameters of ObE in human leukocytes cultures: the techniques used to evaluate the anti-genotoxic parameters were: cell proliferation and inviability, DNA damage, Chromosomal Instability and Micronuclei frequency.

2.7.1 Cellular proliferation and viability: Viability is assessed by the loss of membrane integrity, using the trypan blue [17]. In this technique, the same samples and respective concentrations are combined with Turk's solution (Acid acetic acid 3% plus gentian violet 1% in water), and after three minutes, the sample is placed in a Neubauer chamber. The differentiation of living and dead cells is observed by the blue coloration of dead cells. A total of 300 cells are counted and the amount of total leukocytes (proliferation) is achieved through counting in a Neubauer chamber.

2.7.2 Alkaline comet DNA assay: This test was assayed following procedures of Singh [23]. After incubation, the samples (leukocytes) were mixed with low-melting point agarose and placed on a microscope slide pre-coated with normal melting point agarose. The slides were immersed in a lysis solution, and an electrophoresis was performed (20 min at 300 mA and 25 V). In the end, the slides were neutralized and left to dry overnight at room temperature. The dry slides were re-hydrated and then fixed for 10 min, and left to dry again. The last stage was the coloring and the use of stop solution. The slides were analyzed under blind conditions. DNA damage was given as DNA damage index (DI). The DNA damage was calculated from cells in different damage classes (completely undamaged: 100 cells \times 0 to maximum damaged – 100 cells \times 4).

2.7.3 Chromosomal instability: Colcemid was added in each leukocyte culture and incubated at 37°C during 60 min. After this, the cells were centrifuged at 1,800 rpm for 10 min. The cell pellets were re-suspended in hypotonic solution and incubated at 37°C for 16 min. After a new centrifugation, the cell pellets were re-suspended in acetic acid: methanol (3:1) and poured into a flask containing a fixative solution followed by centrifugation. The slides were prepared by dropping 3 or 4 drops of cell suspension into a cold, wet slide, which then was air dried. The cells were analyzed with 10X magnification to verify the density and distribution of metaphase chromosomes [24].

2.7.4 Micronuclei frequency: The cells were placed in a conic tube with saline and centrifuged in 1,000 rpm for 5 min (this procedure was repeated). One milliliter with the cell pellet was kept in the tubes mixed with the pipette and spread over the slide (two per sample) and left to dry in room temperature. Slides were stained by panoptic method and then analyzed under optical microscopy in immersion lens. For each slide, 1,000 cells were counted [25].

2.8 Evaluation of Anti-inflammatory Parameters of ObE in Human Leukocytes Cultures: For the determination of Necrosis Tumoral Factor- α (TNF- α); Interleukine-10 (IL-10); Interleukine-6 (IL-6), Inhibition of COX-2 activities and Nitric Oxide production, the measurements were made using ELISA kits according to the specific instructions of the manufacturer. All tests were performed in triplicate. The results of

these tests were expressed in percentage of production in relation to the negative control.

2.9. *Statistical analysis:* Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by *post hoc* of Bonferroni for multiple comparison tests. Nonlinear regression analysis was used to determine LD₅₀. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

Medicinal plants are rich sources of natural antioxidants and represent a promising perspective in discovery of new drugs toward therapeutic area. Most members of the Lamiaceae family have shown interesting biological effects due to their antioxidant compounds [26].

Phenolic compounds are broadly distributed in the plant kingdom and are the most abundant secondary metabolites found in plants [27]. The key role of phenolic compounds as antibacterial is emphasized in several reports [26, 28]. Flavonoids compounds occur naturally in plant foods and are a common component of our diet. Table 1 shows the data from analysis by HPLC-DAD method [29] to determine the concentration of totals polyphenol and flavonoids and some compounds present in *Ocimum basilicum* L, all described in literature as biologically active drugs.

Table 1 - Concentrations of some biologically important groups and compounds presents in *Ocimum basilicum* L extract.

Group / Compound	Concentration in $\mu\text{g/g}$ Dry Weight
Polyphenol compounds	23,780.00 \pm 145.30
Total flavonoids	15,982.00 \pm 341.61
Quercetin	558.37 \pm 2.41
Rutin	398.49 \pm 0.97
Gallic acid	2,330.52 \pm 81.19
Caffeic acid	4,780.00 \pm 14.52
Chlorogenic acid	2,875.00 \pm 103.56
Rosmarinic acid	3,530.00 \pm 2.87
Kaempferol	342.00 \pm 18.79

Data expressed as mean \pm S.D. Results were confirmed by the analysis triple repetition and sampling in triplicate.

In Figure 01, we show the dose-effect curve. As it is showed below, when the dose of the extract is increased, the total number of leukocytes decreases, showing a dose-dependent effect. It is important to note that in LD₅₀ concentration (35.44 $\mu\text{g/mL}$), the cellular inviability and DNA Damage showed no significant changes (*data not shown*), corroborating with the study by Gomez-Flores [30]. This result allowed us to establish the doses that were used in our protocols. Aiming to search for a dose with high affectivities and low toxicity, we determine the work doses for this protocol: 35.44 $\mu\text{g/mL}$ (LD₅₀), 3.544 $\mu\text{g/mL}$ (LD_{50/10}) and 0.3544 $\mu\text{g/mL}$ (LD_{50/100}).

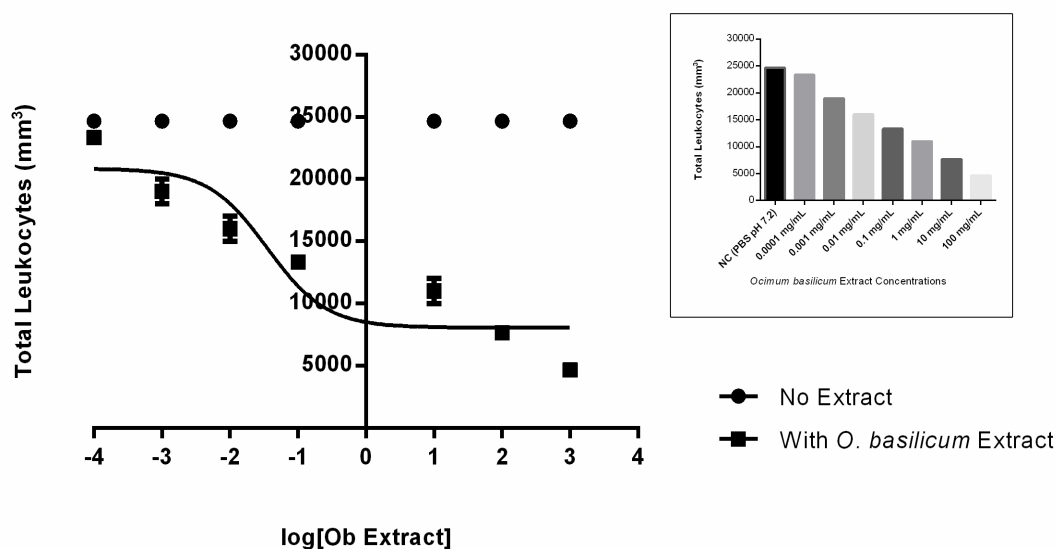


Figure 01 - Dose-effect curve using the crude extract of *Ocimum basilicum* in different doses (0.0001 mg/mL to 100 mg/mL) to determine the lethal dose 50% (LD₅₀) in human leukocytes. The inset shows the total amount of leukocytes versus the tests concentrations of *O. basilicum* extract.

The accumulations of free radicals in organs or tissues are strongly associated with oxidative damages in biomolecules and cell membranes. This can lead to many chronic diseases, such as inflammatory, cancer, diabetes, aging, cardiac dysfunction and other degenerative diseases [31]. Figure 02 demonstrates the results found for oxidative parameters.

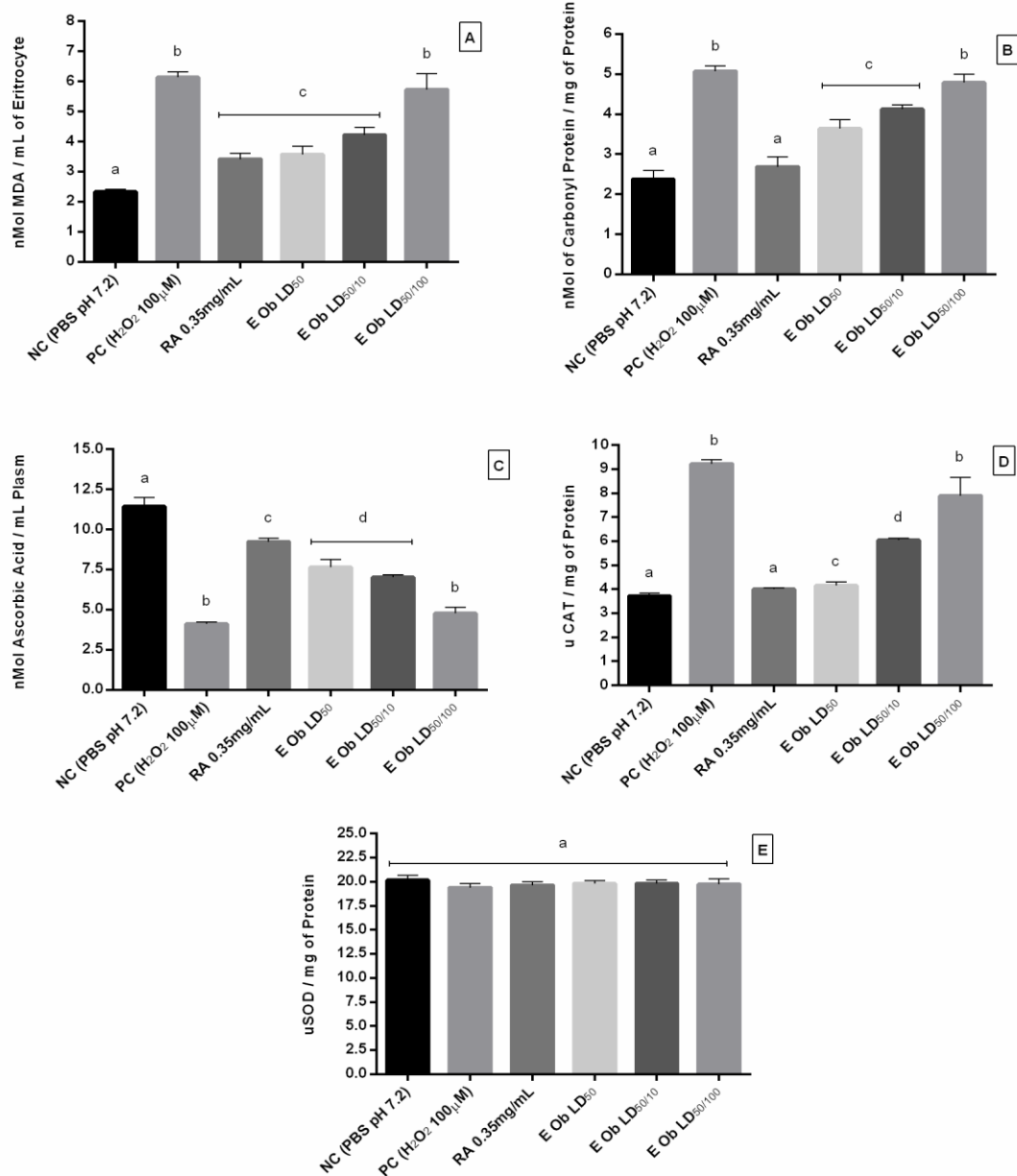


Figure 02 - Effects of *Ocimum basilicum* extract in oxidative parameters of human leukocytes in culture subject to hydrogen peroxide. In A: lipid peroxidation; B: Carbonyl contents; C: Ascorbic Acid; D: Catalase activity; E: Superoxide dismutase activity. NC: Negative Control; PC: Positive Control; RA: Rosmarinic Acid; LD₅₀: concentration equals to LD₅₀ (35.44 μg/mL); LD_{50/10}: 10 times less the concentration of LD₅₀ (3.544 μg/mL); LD_{50/100}: One hundred times less the concentration of LD₅₀ (0.3544 μg/mL). Data are expressed as mean ± S.D. Results were confirmed by an experiment that was repeated three times in triplicate. Different letters represent statistically different results among columns (p<0.05).

The involvement of reactive oxygen species in interactions with polyunsaturated fatty acids in cell membranes generates what is called lipid peroxidation. The result is the formation of hydro or lipoperoxides highly reactive that may trigger the oxidative cascade resulting in damage to membrane integrity [32]. The results found in lipid peroxidation show that LD₅₀ and LD_{50/10} obtained values are close to the control of rosmarinic acid, a well know antioxidant agent. Moreover, the values of peroxidation in LD₅₀ 3,576 nMol of MDA/mL in erythrocytes and LD_{50/10} 4,226 nMol of MDA/mL in erythrocytes, were 41,81% and 31,29% lower when compared to the positive control, respectively. The content of protein carbonyl is the most general indicator and the most commonly used marker of protein oxidation, and its accumulation has been observed in several human diseases [33]. In protein carbonyl the values found show that LD₅₀ was 28% and LD_{50/10} 18,8% lower when compared to the positive control, and approximate to negative control and rosmarinic acid control. The vitamin C or acid ascorbic has been implicated in different biological processes and plays an important role in oxidant defense. Acid ascorbic have function in several enzymatic steps acting like a cofactor in the synthesis of collagen, monoamines, amino acids, peptide hormones, and carnitine. Samples with higher concentrations of extract showed higher concentrations of ascorbic acid. This fact is directly related to the concentrations of polyphenols and antioxidant action. The most concentrated samples, LD₅₀ and DL_{50/10}, have higher levels of polyphenols. Polyphenols are a first line of defense against oxidative action of hydrogen peroxide. When polyphenols decrease their concentrations, other non-enzymatic antioxidants come into play, thereby reducing the concentration of vitamin C [35, 36].

Mammalian cells have elaborate antioxidant defense mechanisms to control damage effects of reactive oxygen species (ROS) and the catalase enzyme is one of these, protecting cells against the toxic effects of hydrogen peroxide [37]. The results of Catalase analysis show the ability of *O. basilicum* extract in neutralizing the effects of hydrogen peroxide. The results were dose-related and show a better effect at LD₅₀ concentration. Superoxide has been implicated in reactions associated with aging, in pathophysiological processes, due to its transformation into more reactive species, like hydroxyl radical that initiates lipid peroxidation.

According to our results, the activity of SOD enzyme was not affected in the three concentrations of *O. basilicum* extract. All these results are related to the presence of antioxidant compounds present in the extract (Table 01), as the groups of polyphenols and flavonoids. This information confirms the data from the literature that phenolic compounds, especially flavonoids act in the oxidative metabolism, not by changing the enzymatic defenses, but by directing neutralizing of reactive species in order to stabilize them [38].

We also evaluated the effects of hydrogen peroxide and the counter effects of *O. basilicum* extract on human leukocytes cells. The results of these markers are show in Figure 03.

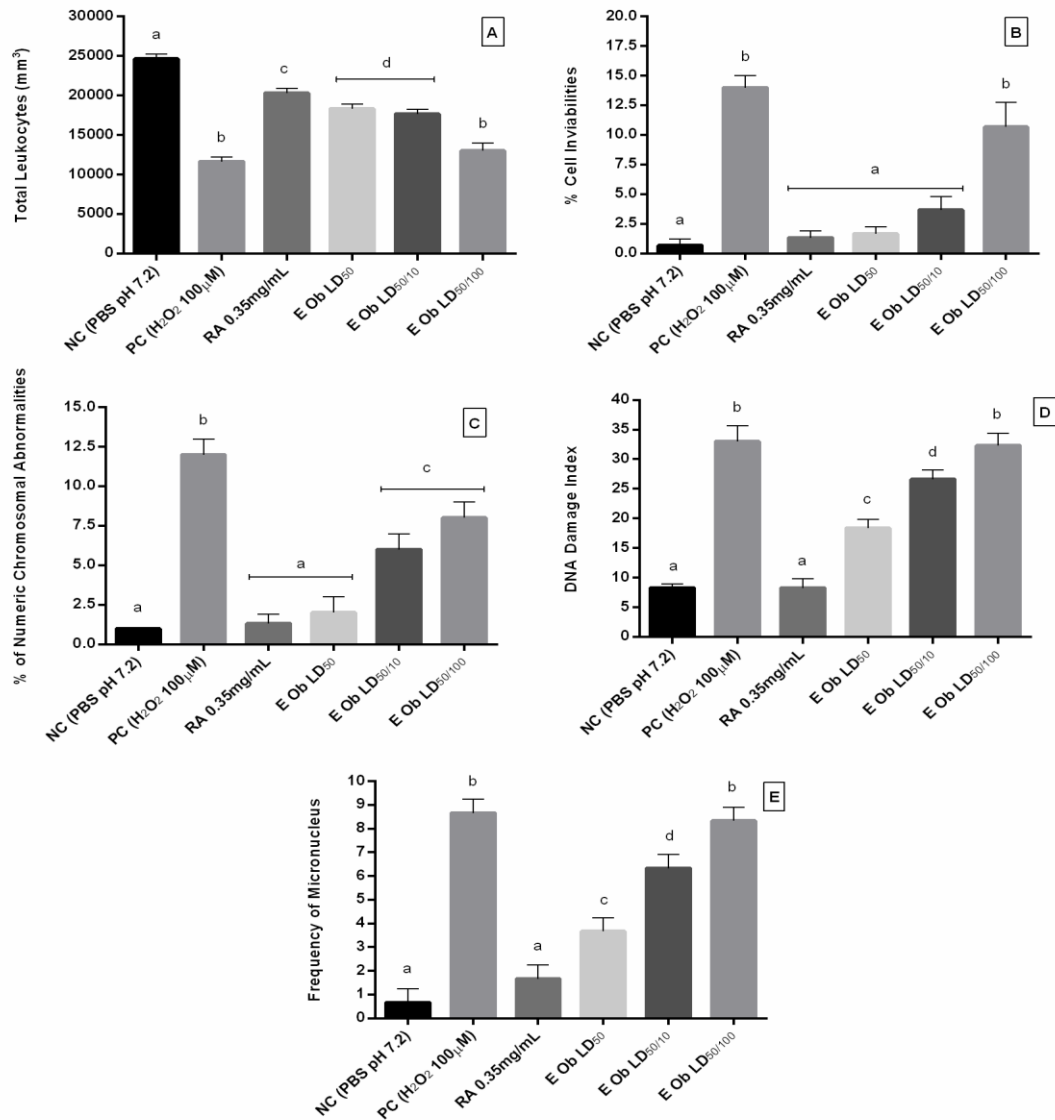


Figure 03 - Effects of *Ocimum basilicum* extract in anti-genotoxic parameters of human leukocytes in culture exposed to hydrogen peroxide. In A: cell proliferation; B: cell inviability; C: percentage of abnormal chromossomics; D: DNA damage index; E: frequency of micronuclei. NC: Negative Control; PC: Positive Control; RA: Rosmarinic Acid; LD₅₀: concentration equals to LD₅₀ (35.44 μg/mL); LD_{50/10}: 10 times less the concentration of LD₅₀ (3.544 μg/mL); LD_{50/100}: One hundred times less the concentration of LD₅₀ (0.3544 μg/mL). Data are expressed as mean ± S.D. Results were confirmed by an experiment that was repeated three times in triplicate. Different letters represent statistically different results among columns (p<0.05).

In cellular proliferation (Figure 3A), the concentrations of LD₅₀ and LD_{50/100} the cellular increase was similar to the rosmarinic acid control and different from the positive control, whereas the lowest concentration LD_{50/100} presented a decrease in cellular proliferation witch may be compared to the positive control. Figure 3B shows the percentage of unviable cells for both controls groups and for the three concentrations groups tested. The negative control presented only 0.667% whereas

positive control was 14% of unviable cells. Rosmarinic acid was 1.33% and the other three concentrations of *O. basilicum*: LD₅₀: 1.667%; LD_{50/10}: 3.67%; LD_{50/100}: 10.67% of unviable cells.

According to Collins [39], the high viability of cells is required as a previous condition for the performance of the comet assay. Chromosomal instability results in numerical and structural chromosomal complexity and several studies associated these instabilities with poor prognosis in solid tumors [40].

The results demonstrate that all concentrations of extract of Basil have presented percentages of chromosomal abnormalities (Figure 3C) similar to the negative control and even the lowest concentration presented 33.334% less mitotic index when compared to positive control.

The comet assay is one of the most promising genotoxicity tests developed to measure and analyze DNA damage in single cells [41]. The test was used as a parameter for assessing the DNA damage index (Figure 3D). As we can see at the lowest concentration - LD_{50/100}, the cells presented the highest damage index compared with positive control, whereas the other two concentrations of extract, LD₅₀ and LD_{50/10}, showed damage index of 44.45% and 19.18% lower when compared with the positive control, respectively.

The micronuclei assay provides a convenient and reliable index of both chromosome breakage and chromosome loss. The micronuclei are expressed in dividing cells that either contain chromosome breaks lacking centromeres (acentric fragments) and/or whole chromosomes that are unable to migrate to the poles during mitosis [42]. The results show the micronucleus frequency (MN) found at the control groups and three concentrations of plant extract under analysis (Figure 3E). The frequency of MN was dose-dependent. The lowest concentration of the extract has shown the highest frequency of cells with this alteration.

The Basil was frequently related as a common anti-inflammatory [43]. Aiming to confirm this activity and evaluate the mechanism involved, we perform a series of tests in human leukocytes cell exposed to a pro-inflammatory agent. The results are presented in Figure 04.

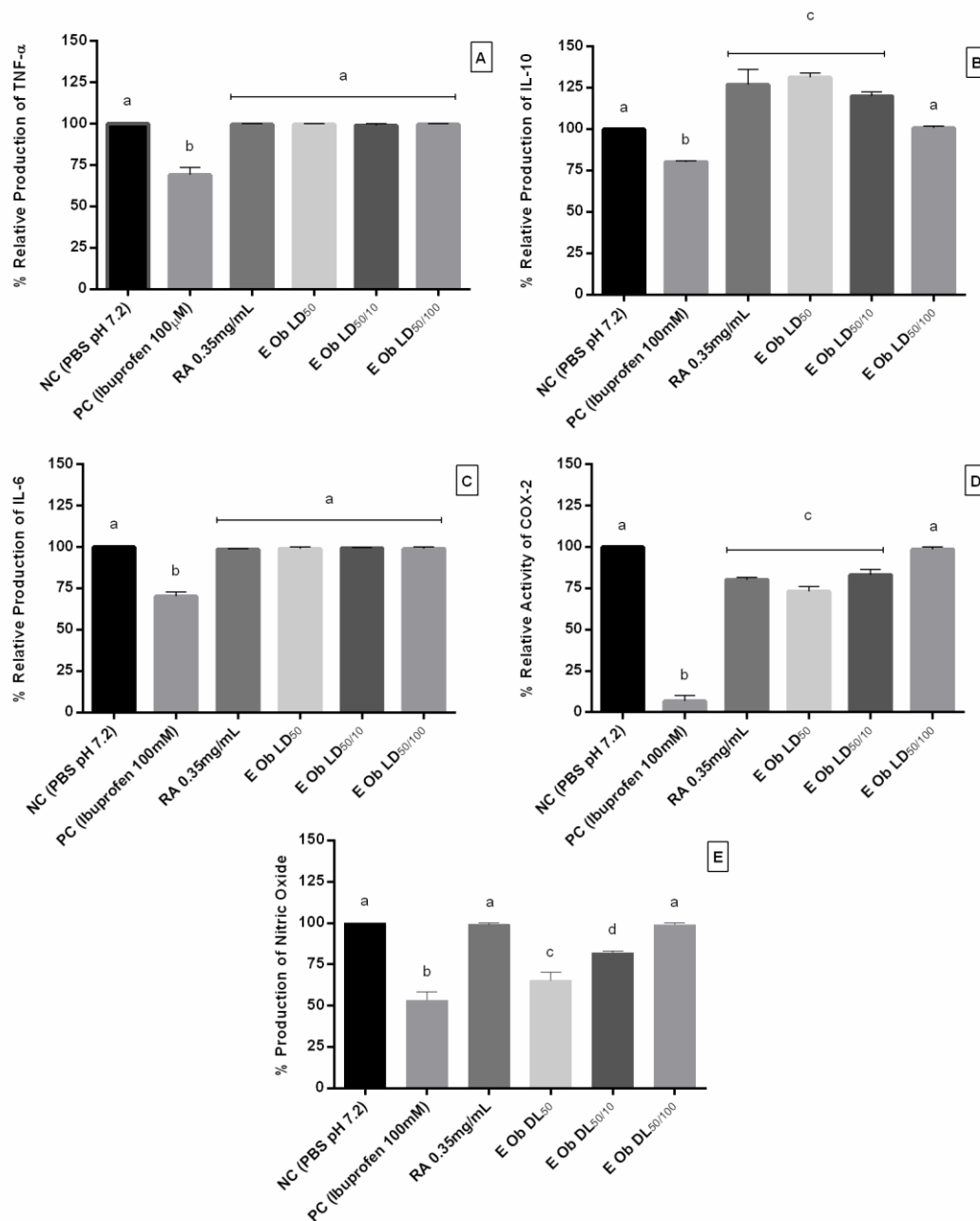


Figure 04 - Effects of *Ocimum basilicum* extract in inflammatory parameters of human leukocytes in culture exposed to dextran solution. All the results are presented as percentage in relation to the negative control. In A: tumoral necrose factor- α (TNF- α); B; interleukine-10 (IL-10); C: interleukine-6 (IL-6); D: Ciclooxygenase type 2 activity (COX2 activity); E: nitric oxide (NO) production. NC: Negative Control; PC: Positive Control; RA: Rosmarinic Acid; LD₅₀: concentration equals to LD₅₀ (35.44 μ g/mL); LD_{50/10}: 10 times less the concentration of LD₅₀ (3.544 μ g/mL); LD_{50/100}: One hundred times less the concentration of LD₅₀ (0.3544 μ g/mL). Data are expressed as mean \pm S.D. Results were confirmed by an experiment that was repeated three times in triplicate. Different letters represent statistically different results among columns (p<0.05).

Cytokines are subdivided in proinflammatory (initiate defense against pathogens) and anti-inflammatory (regulate the inflammatory process helping to balance the inflammatory response) acting with an important role in inflammatory response. The proinflammatory cytokines includes IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , and the anti-inflammatory cytokines includes IL-1 antagonist receptor, IL-4, IL-10, and IL-13 [44]. The results show that the production of the proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL – 6, were not affected in the three different doses of *O. basilicum* extract. However, the percentage of production of IL-10, the anti-inflammatory cytokine, shows an increase in the percentage of more than 60% at the highest dose of the extract when compared with the positive control (Ibuprofen). The percentage of production of IL-10 also demonstrated to be dose-dependent, but in all concentrations this production was higher than the negative and positive controls. The cyclooxygenases (COX) have been identified in three different isoforms. COX-2 acts like the inducible isoform, which is regulated by growth factors and different cytokines (IL1 β , IL6, or TNF α) [45]. The ability of the extract from *Ocimum basilicum* to inhibit COX-2 was determined and the results show that the extract was not capable to reduce the activity of the cyclooxygenase like the positive control (Ibuprofen) but his activity decrease when compared to the negative control (100%) and was dose-dependent. The inhibition of COX-2 in LD₅₀ and LD_{50/10} approximates to the inhibition caused by rosmarinic acid and several studies report many properties of rosmarinic acid including cyclooxygenase inhibition [35, 36].

The percentage of nitric oxide generated was measured and cells pretreated with the three plant extracts showed a dose-dependent inhibition. The negative control was considered 100%. The maximal NO inhibitory effect was exhibited by *O. basilicum* at dose of LD₅₀. Comparing to the negative control, the percentage of reduction was higher than 30% (34.67%). In a similar study using three plants of Lamiaceae family, *O. basilicum* extract demonstrated the higher content of phenols and also maximal levels of DNA protection and free radical scavenging against toxicity induced by cadmium chloride [46]. The results suggested that the anti-inflammatory activities of these extracts could be explained, at least in part, by their antioxidant properties [34]. Rosmarinic acid was one of the most abundant caffeic acid esters present in *O. basilicum* [34]. It has been related that this compound has antioxidant, anti-HIV, and anti-inflammatory or cyclooxygenase and lipooxygenases inhibitory activities [35, 36].

4. Conclusions

It is possible to verify that *Ocimum basilicum* extract acts as an antioxidant and effectively reverts or subjugates the effects of a high oxidizing agent as hydrogen peroxide. These actions are explained by its composition, which is rich in polyphenols and flavonoids besides several compound as Rosmarinic Acid, who have a well know antioxidant activity.

In the anti-inflammatory aspect, we show that our extract actually presents this properties and the mechanism involved in this particular actions are a composed interaction between the inhibition of pro-inflammatory mediator and the stimulation of anti-inflammatory cytokines.

Although pharmacodynamics studies are necessary to evaluate the activities *in vivo*, our results demonstrated that Basil could act as antioxidant and anti-inflammatory, becoming a possible alternative for medicinal treatment.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors are thankful to the financial support of Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

[1] B. Gillham, D. K. Papachristodoulou, J. H. W. Thomas, "Biochemical basis of medicine," *Oxford: Reed Educational And Professional Publishing Ltda*, Ed. 3, pp. 196-202, 1997.

- [2] C. W. Choi, et al., “Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison,” *Plant Science*, vol. 163, no.6, pp. 1161-1168, 2002.
- [3] F. Danesi, S. Elementi, R. Neri, M. D’antuono. Maranesi, E. Bordoni, “Effect of cultivar on the protection of cardiomyocytes from oxidative stress by essential oils and aqueous extracts of Basil,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 21, pp. 9911–9917, 2008.
- [4] S. A. Sakr, W. M. Al-Amoudi, “Effect of leave extract of *Ocimum basilicum* on deltamethrin induced nephrotoxicity and oxidative stress in albino rats,” *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 02, no. 05, pp. 22-27, 2012.
- [5] F. V. Roberto, J. E. Simon, “Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil,” *Economic Botany*, vol. 54, no. 2, pp.207–216, 2000.
- [6] J. Lee, C. F. Scagel, “Chicoric acid found in basil (*Ocimum Basilicum* L.) leaves,” *Food Chemistry*, vol. 115, no. 2, pp. 650–656, 2009.
- [7] T. Shiga, K. Shoji, H. Shimada, S. N. Hashida, F. Goto, T. Yoshihara, “Effect of light quality on rosmarinic acid content and antioxidant activity of sweet basil, *Ocimum Basilicum* L.,” *Plant Biotechnology Journal*, vol. 26, no. 2, pp. 255–259, 2009.
- [8] J. Javanmardi, A. Khalighi, A. Kashi, H. P. Bais, J. M. Vivanco, “Chemical characterization of basil (*Ocimum Basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran,” *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, vol. 50, no. 21, pp. 5878–5883, 2002.
- [9] Z. Liber, K. J. Stanko, O. Politeoc, F. Strikic, I. Kolakb, M. Milosc, Z. Satovicb, Z. “Chemical Characterization and Genetic Relationships among *Ocimum basilicum* L. Cultivars,” *Chemistry & biodiversity*, vol. 8, no. 11, pp. 1978-1989, 2011.

- [10] S. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K. G. LEE, "Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties" *Food Chemistry*, vol. 91, no. 1, pp. 131–137, 2005.
- [11] A. A. Boligon, A. C. Feltrin, M. M. Machado, V. Janonik, M. L. Athayde "HPLC analysis and phytoconstituents isolated from ethyl acetate fraction of *Scutia Buxifolia* Reiss. Leaves," *Latin American Journal Of Pharmacy*, vol. 28, no. 1, pp. 121-124, 2009.
- [12] A. H. Laghari, S. Memon, A. Nelofar, K. M. Khan, A. Yasmin, "Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*," *Food Chemistry*. vol. 126, no 4, pp. 1850–1855, 2011.
- [13] M. M. Machado, F. F. F. dos S. Montagner, A. Boligon, M. L. Athayde, M. I. U. Rocha, J. P. Lera, C. Belló, I. B. M. da Cruz, "Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops," *Química Nova*. vol.34, no.5, pp. 798-803, 2011.
- [14] S. Chandra, E. G. Mejia, "Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp. 3583-3589, 2004.
- [15] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals," *Food Chemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 555-559, 1999.
- [16] G. F. F. Santos Montagner, M. Sagrillo, M. M. Machado, R.C. Almeida, C. P. Mostardeiro, M. F. F. Duarte, I. B. M. Cruz, "Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16val polymorphism genotypes," *Toxicology In Vitro*, vol. 24, pp. 1410-1416, 2010.

- [17] M. E. Burow, C. B. Weldon, Y. Tang, G. L. Navar, S. Krajewsky, J. C. Reed, T. G. Hammond, S. Clejan, B. S. Beckman, "Differences in susceptibility to tumor necrosis factor A- induced apoptosis among mcf-7 breast cancer cell variants," *Cancer Research*, vol. 58, no. 21, pp. 4940-4946, 1998.
- [18] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351-358, 1979.
- [19] F. Morabito, M. Cristiani, A. Saija, C. Stelitano, V. Callea, A. Tomaino, P. L. Minciullo, S. Gangemi, "Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma," *Mediators Of Inflammation*. vol.13, no. 5-6, pp. 381-383, 2004.
- [20] M. C. Jacques-Silva, C. W. Nogueira, L. C. Broch, E. M Flores, J. B. T. Rocha. "Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice," *Pharmacology & Toxicology*, vol. 88, no. 3, pp.119-125, 2001.
- [21] H. Aebi, S. R. Wyss, B. Scherze, F. Skvaril, "Heterogeneity of erythrocyte catalase isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunit," *Enzyme*, vol. 17, no. 5, pp. 307- 318, 1974.
- [22] A. Boveris, E. Cadenas, "Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch L, Massaro D. "Oxygen, gene expression and cellular function," Marcel Decker: New York, vol. 105, pp. 1-25, 1997.
- [23] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. A. Schneider "A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells," *Experimental Cell Research*. vol. 175, pp. 184-191, 1995.
- [24] J. J. Yunis, "High resolution of human chromosomes," *Science*, vol. 191, no. 4233, pp. 1268-1270, 1976.

- [25] W. Schmid, "The Micronucleus Test," *Mutation Research*, vol. 31, pp. 09-15, 1975.
- [26] P. Schofield, D. M. Mbugua, A. N. Pell, "Analysis of condensed tannins: A review," *Animal Feed Science and technology*, vol. 91, no.1-2, pp. 21-40, 2001.
- [27] A. S. Komali, Z. Zheng, K. Shetty, "A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species," *Process Biochemistry*, vol. 35, no. 3, pp. 227-235, 1999.
- [28] J. K. S. Moller, H. L. Madsen, T. Altonen, L. H. Skibsted, "Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants," *Food Chemistry*, vol. 64, no. 2, pp. 215-219, 1999.
- [29] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 20, no. 7, pp. 933-956, 1996.
- [30] R. Gomez-Flores, L. Verástegui-Rodríguez, R. Quintanilla-Licea, P. Tamez-Guerra, R. Tamez-Guerra, C. Rodríguez-Padilla, "In vitro rat lymphocyte proliferation induced by *Ocimum basilicum*, *Persea americana*, *Lantago virginica*, and *Rosa* spp. extracts," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 2, no. 1, pp. 005-010, 2008.
- [31] S. Wang, E. A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi, B. Kalyanaraman, "Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms, intermediacy of H₂O₂ and P53- dependent pathways," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 24, pp. 25535-25543, 2004.
- [32] A. H. K. Tsang, & K. K. K. Chung, "Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1792, no. 7, pp. 643-650, 2009.
- [33] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, A. Colombo, "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress," *Clinica Chimica Acta*, vol. 329, no. 1-2, pp. 23-38, 2003.

- [34] C. Jayasinghe, N. Gotoh, T. Aoki, S. Wada, "Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum Basilicum* L.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 15, pp. 4442-4449, 2003.
- [35] M. A. Kelm, M. G. Nair, G. M. Strasburg, D. L. Dewitt, "Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn.," *Phytomedicine*, vol. 7, no. 1, pp. 7-13, 2000.
- [36] M. Petersen, M. S. J. Simmonds, "Molecules of interest: Rosmarinic acid," *Phytochemistry*, vol. 62, pp. 1212-125, 2003.
- [37] M. M. Goyal, A. Basak, "Human catalase: Looking for complete identity," *Protein & Cell*, vol. 1, no. 10, pp. 888-897, 2010.
- [38] X. Liu, C. Cui, M. Zhao, J. Wang, W. Luo, B. Yang, Y. Jiang, "Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities," *Food Chemistry*, vol. 109, no. 4, pp. 909-915, 2008.
- [39] A. R. Collins, A. A. Ocoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith, R. Stetina, "The comet assay: Topical issues," *Mutagenesis*, vol.23, no.3, pp.143-151, 2008.
- [40] N. J. Birckbak, A. C. Eklund, Q. Li, S. E. McClelland, D. Endesfelder, P. Tan, I. B. Tan, A. L. Richardson, Z. Szallasi, C. Swanton, "Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer," *Cancer Research*, vol. 71, no. 10, p.p. 3447-3452, 2011.
- [41] I. Mukhopadhyay, D. K. Chowdhuri, M. Bajpayee, A. Dhawan, "Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in drosophila melanogaster using the alkaline comet assay," *Mutagenesis*, vol. 19, no. 2, pp. 85-90, 2004.
- [42] M. Fenech, "The *in vitro* micronucleus technique," *Mutation Research*, vol. 455, no. 1-2 pp. 81-95, 2000.

- [43] A. Durasaisamy, N. Narayanaswamy, A. Sebastian, K. P. Balakrishnan “Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants,” *International Journal of Research in Cosmetic Science*, vol. 1, no. 1, pp. 13-16, 2011.
- [44] S. L. Goldstein, J. C. Leung, D. M. Silverstein, “Pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic pediatric dialysis patients: Effect of aspirin,” *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol 1, 979 –986, 2006.
- [45] C. Sobolewski, C. Cerella, M. Dicato, L. Ghibelli, M. Diederich, “The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies,” *International Journal Of Cell Biology* , vol. 2010, Article ID 215158, 21 pages, 2010.
- [46] R. Thirugnanasampandan, R. Jayakumar, “Protection of cadmium chloride induced DNA damage by Lamiaceae plants,” *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, vol. 1, no. 5, pp. 391-394, 2011.

PARTE III

5 DISCUSSÃO GERAL

As plantas são fontes ricas na obtenção de antioxidantes naturais, podendo representar uma perspectiva promissora na descoberta de novas drogas, no que diz respeito à área terapêutica. Grande parte dos membros pertencentes à família Lamiaceae, demonstram ter efeitos biológicos interessantes devido à presença destes compostos antioxidantes (SCHOFIELD et. al., 2001).

O papel-chave dos compostos fenólicos como antibacterianos é enfatizada em muitos estudos (SCHOFIELD et. al., 2001; MOLLER et. al., 1999). Os flavonoides ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal o que o torna um componente comum presente em nossa dieta. A **Tabela 01 do manuscrito** mostra os dados da análise realizada através do método de HPLC-DAD (RICE-EVANS et. al., 1996) para determinar a concentração de polifenóis totais e flavonoides e alguns compostos presentes no *Ocimum basilicum* L, todos descritos como biologicamente ativos. Os resultados mostraram que o material analisado apresenta concentrações elevadas de compostos antioxidantes, em especial dos ácidos Rosmarínico, Caféico, Clorogênico e Gálico, todos na ordem de mg/g de planta. Cabe salientar que todos estes compostos apresentam níveis amplamente variantes no gênero *Ocimum* (SHIGA et. al., 2009).

Na **Figura 01 do manuscrito**, é demonstrada a curva dose-efeito do extrato de *O. basilicum* L. onde foi possível observar que com o aumento da concentração do extrato o número total de leucócitos diminuía, em uma relação de efeito dose-dependente. Na concentração determinada como DL₅₀ (35,44 µg/mL) é importante salientar que os testes de inviabilidade celular e de dano ao DNA não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados), resultado esse que corrobora o estudo realizado por Gomez-Flores e colaboradores (2008). A partir desse resultado foi possível estabelecer as doses que foram utilizadas nos protocolos da pesquisa. Tendo como objetivo procurar uma dose com alta efetividade e baixa toxicidade, as doses de trabalho utilizadas, foram de 35,44 µg/mL (DL₅₀), 3,544 µg/mL (DL_{50/10}) e 0,3544 µg/mL (DL_{50/100}).

O acúmulo de radicais livres em órgãos ou tecidos está fortemente associado com os danos oxidativos causados nas biomoléculas e nas membranas celulares. Danos esses, que podem induzir a diversas doenças crônicas, como processos inflamatórios,

câncer, diabetes, envelhecimento, disfunção cardíaca e outras doenças degenerativas (WANG et. al., 2004). A **Figura 02 do manuscrito** mostra o resultado encontrado em relação aos parâmetros oxidativos, peroxidação lipídica, proteína carbonilada, ácido ascórbico, atividade da enzima catalase, atividade da enzima superóxido dismutase do extrato de *O. basilicum*.

A participação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em interações com ácidos graxos poliinsaturados em membranas celulares gera o que é usualmente chamado de peroxidação lipídica. O resultado dessa reação é a formação de hidro ou lipoperóxidos altamente reativos que podem desencadear a cascata oxidativa, resultando em danos à integridade celular (TSANG & CHUNG, 2009).

Os resultados encontrados no ensaio da peroxidação lipídica demonstraram que os valores de DL₅₀ e DL_{50/10} obtidos aproximam-se ao controle de ácido rosmarínico, um agente antioxidante bastante conhecido. Além disso, os valores da peroxidação obtidos para DL₅₀ (3,576 nMol de MDA/mL em eritrócitos) e DL_{50/10} (4,226 nMol de MDA/mL em eritrócitos) foram 41,81% e 31,29%, mais baixos quando comparados ao controle positivo, respectivamente. O conteúdo de proteína carbonilada é o marcador mais geral e comumente utilizado na determinação da oxidação protéica e seu acúmulo tem sido observado em diversas doenças (DALLE-DONNE et. al.,2003). Os valores de proteína carbonilada encontrados mostraram que para DL₅₀ e DL_{50/10}, os valores foram, respectivamente, de 28% e de 18,8% menores quando comparados com o controle positivo. Valores esses que se aproximam ao controle negativo e ao controle de ácido rosmarínico. A vitamina C (ácido ascórbico), tem sido implicada em vários processos biológicos e tem um papel importante na defesa antioxidante. O ácido ascórbico tem função em diversos passos enzimáticos agindo como cofator na síntese de colágeno, monoaminas, aminoácidos, hormônios peptídicos e carnitina. As amostras com maior concentração de extrato mostraram maiores concentrações de ácido ascórbico. Esse fato está diretamente relacionado com as concentrações de polifenóis e com a ação antioxidante. As amostras mais concentradas, DL₅₀ e DL_{50/10}, apresentam maiores teores de polifenóis. Os polifenóis constituem uma primeira linha de defesa contra a ação oxidante do peróxido de hidrogênio. Quando os polifenóis diminuem suas concentrações, outros antioxidantes não enzimáticos, entram em ação, reduzindo assim as concentrações de vitamina C.

As células do nosso organismo desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante para o controle dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) e a enzima catalase é um desses exemplos, por possuir um papel importante na proteção das células contra os efeitos tóxicos causados pelo peróxido de hidrogênio (GOYAL & BASAK, 2010). Os resultados encontrados para a enzima *Catalase* demonstraram a capacidade do extrato de *O. basilicum* em neutralizar os efeitos do peróxido de hidrogênio, os quais foram dose-dependente, com melhores resultados na concentração utilizada para DL₅₀. O superóxido tem sido implicado em reações associadas ao envelhecimento, em processos patofisiológicos, devido a sua transformação em espécies mais reativas, como por exemplo, o radical hidroxila o qual é responsável pelo início da peroxidação lipídica.

De acordo com o resultado encontrado, a atividade da enzima SOD não foi afetada em nenhuma das concentrações do extrato de *O. basilicum*. Podendo ser possível correlacionar com a presença dos compostos antioxidantes presentes no extrato (**Tabela 01 do manuscrito**), como polifenóis e flavonoides. Esses dados confirmam aos encontrados na literatura que relatam que os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, agem no metabolismo oxidativo, não por alteração das defesas enzimáticas, mas sim na neutralização direta das espécies reativas a fim de estabilizá-las (LIU et. al., 2008), além disso, cabe salientar que o peróxido de hidrogênio utilizado como indutor da oxidação no protocolo não é um substrato direto da SOD.

Também foram avaliados os efeitos do peróxido de hidrogênio no extrato de *Ocimum basilicum* em cultura de leucócitos humanos, avaliando parâmetros antigenotóxicos como, proliferação celular, inviabilidade celular, porcentagem de cromossomos anormais, índice de dano ao DNA e frequência de micronúcleos. Os resultados desses marcadores estão demonstrados na **Figura 03 do manuscrito**. Na proliferação celular, **Figura 3A do manuscrito**, para as concentrações de DL₅₀ e DL_{50/10} o aumento celular foi similar ao controle de ácido rosmarínico e diferente em relação ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), enquanto que a concentração mais baixa (DL_{50/100}) demonstrou um decréscimo na proliferação celular, o qual pode ser comparado ao controle positivo. A **Figura 3B do manuscrito** mostra a porcentagem de células inviáveis para ambos os grupos controle e para as três concentrações de extrato testadas. O controle negativo apresentou apenas 0,667% de células inviáveis enquanto que o controle positivo foi de 14%. O ácido rosmarínico apresentou 1,33% de

células inviáveis e para as outras concentrações de extrato foi DL₅₀: 1.667%; DL_{50/10}: 3.67%; DL_{50/100}: 10.67% de células inviáveis.

De acordo com Collins e colaboradores (2008), a alta viabilidade de células é requerida como uma condição prévia para que se tenha um bom desempenho no ensaio cometa. A instabilidade cromossômica resulta em complexos numéricos e estruturais cromossômicos e diversos estudos associam essas instabilidades com um mau prognóstico em tumores sólidos (BIRKBAK et. al., 2011). Os resultados também mostram que todas as concentrações do extrato do Manjeriço apresentaram porcentagens de anormalidade cromossômica (**Figura 3C do manuscrito**) similares aos do controle negativo e mesmo na concentração mais baixa do extrato, o índice mitótico foi 33,334% menor, quando comparado ao controle positivo. O ensaio cometa é um dos ensaios genotóxicos mais promissores e foi desenvolvido para determinar e analisar o dano causado ao DNA, utilizando células isoladas (MUKHOPADHYAY et. al., 2004). O teste foi utilizado como um parâmetro para avaliar o índice de dano ao DNA (**Figura 3D do manuscrito**). Na menor concentração DL_{50/100}, as células apresentaram o maior índice de dano ao ser comparado com o controle positivo, enquanto que para as outras duas concentrações de extrato DL₅₀ e D_{50/10}, mostraram um índice de dano de 44,45% e 19,18%, menor quando comparadas com o controle positivo, respectivamente. O teste do micronúcleo fornece um índice confiável que representa perdas ou quebras cromossômicas. O micronúcleo é expresso em células no processo de divisão, as quais possam conter quebras cromossômicas com falta de centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros, porém, que não são capazes de migrar para os pólos durante a mitose (FENECH, 2000). Na **Figura 3E do manuscrito**, a frequência de micronúcleos foi dose-dependente, ou seja, quanto menor a concentração do extrato do manjeriço, maior a frequência de micronúcleos.

O manjeriço sempre foi relatado como um potente anti-inflamatório (DURASAISAMY, 2011). Visando a confirmação dessa atividade e buscando avaliar o mecanismo envolvido, foram realizados testes em leucócitos humanos expostos à agentes pró-inflamatórios. Os resultados estão demonstrados na **Figura 04 do manuscrito**.

As citocinas são subdivididas em pró-inflamatórias, as quais se relacionam ao início da defesa contra agentes patogênicos e as citocinas anti-inflamatórias, que

regulam o processo e ajudam no equilíbrio da resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias incluem as interleucinas (IL) 1, IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) enquanto que as citocinas anti-inflamatórias incluem o receptor antagonista da IL-1, IL-4, IL-10, e IL-13 (GOLDSTEIN, 2006). Os resultados demonstraram que a produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL – 6), não foram afetadas nas três diferentes doses do extrato de *O. basilicum*. No entanto, a porcentagem de produção da IL-10, a citocina anti-inflamatória, demonstrou um aumento de mais de 60% na dose mais alta do extrato, quando comparada com o controle de Ibuprofeno. A porcentagem de produção da IL-10 também demonstrou dose-dependência, porém em todas as concentrações essa produção foi maior em relação aos controles positivo e negativo. As ciclooxygenases (COX) são identificadas em três isoformas principais, a COX-2 é a isoforma que age de forma indutível, a qual é regulada por fatores de crescimento e outras citocinas (IL1 β , IL6, ou TNF- α) (SOBOLEWSKI et al., 2010). A habilidade do extrato de *O. basilicum* em inibir a COX-2 foi determinada e os resultados mostraram que o extrato não reduziu a atividade da ciclooxygenase, diferentemente do que ocorre com o controle positivo (Ibuprofeno), mas essa atividade aumentou quando comparada ao controle negativo (100%) e também apresentou o efeito dose-dependente. A inibição da COX-2 na DL₅₀ e na DL_{50/10} se aproxima à inibição causada pelo ácido rosmarínico, corroborando com estudos que relatam as propriedades do ácido rosmarínico, incluindo a inibição das ciclooxygenases (KELM et al., 2000; PETERSEN & SIMMONDS, 2003) .

A porcentagem de óxido nítrico (NO) gerado foi determinada e as células pré-tratadas com as três concentrações do extrato mostraram uma inibição dose-dependente. O controle negativo foi considerado 100%. O efeito inibitório máximo de óxido nítrico no extrato foi na DL₅₀, e quando comparado ao controle negativo, a porcentagem de redução foi de 34,67%. Em um estudo similar, utilizando três plantas pertencentes à família Lamiaceae, o extrato de *O. basilicum* demonstrou possuir o maior conteúdo de fenóis, assim como elevados níveis de proteção ao DNA e captura de radicais livres em resposta à toxicidade induzida pelo cloreto de cádmio (THIRUGNANASAMPANDAN & JAYAKUMAR, 2011). Os resultados sugerem que a atividade antiinflamatória desses extratos pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas suas propriedades antioxidantes (JAYASINGHE et al., 2003). O ácido rosmarínico foi o éster de ácido cafeico em maior abundância encontrado no *O. basilicum* (JAYASINGHE et al., 2003). Esse composto tem sido relatado por apresentar atividade antioxidante e por apresentar

atividade anti-inflamatória através da inibição das ciclooxigenases e/ou lipooxigenases (KELM et. al., 2000; PETERSEN & SIMMONDS, 2003).

6 CONCLUSÕES

Através desse estudo, foi possível verificar que o extrato de *Ocimum basilicum* age como um antioxidante e efetivamente reverte/reduz os efeitos de um agente antioxidante forte, como é o caso do peróxido de hidrogênio. Essas ações podem ser explicadas devido à composição do extrato, pela abundância de polifenóis e flavonóides ou a presença de outros compostos como o ácido rosmarínico, o qual possui potencial antioxidante bem estabelecido e conhecido na literatura.

Na avaliação dos parâmetros genotoxicológicos, as concentrações do extrato apresentaram-se dose-dependentes em todos os testes aplicados, porém torna-se necessário destacar que a concentração correspondente ao valor de DL₅₀ apresentou resultados similares ao controle de ácido rosmarínico, tido como um controle antioxidante.

Nos parâmetros anti-inflamatórios, foi demonstrado que o extrato possui compostos com essa propriedade e o mecanismo possivelmente envolvido corresponde a uma interação entre a inibição dos mediadores inflamatórios e o estímulo de citocinas mediadoras anti-inflamatórias.

Nossos resultados sugerem que o Manjerição pode agir como antioxidante e anti-inflamatório surgindo como uma possível alternativa no tratamento médico, no entanto, são necessários estudos de farmacodinâmica para avaliar sua atividade *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M. S.; MUNIR, M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of solanum nigrum, brassica oleracea and ocimum basilicum in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 27, no. 1-2, pp. 163 -176, 1989.

ARCT, J. E PYTKOWSKA, K. Flavonoids As Components Of Biologically Active Cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, vol.26, no.4, pp.347-357, 2008.

BERIČ, T.; et al. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, no. 2, pp. 724–732, 2008.

BIRKBAK, N. J., EKLUND, A. C., LI, Q., MCCLELLAND, S. E., ENDESFELDER, D., TAN, P., TAN, I. B., RICHARDSON, A. L., SZALLASI, Z., SWANTON, C., “Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer,” **Cancer Research**, vol. 71, no. 10, pp. 3447-3452, 2011.

BIESALSKI, H.K. Free Radical Theory Of Aging. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, vol. 5, no. 1, pp. 5-10, 2002.

BRAVO, E., AMRANI, S., AZIZ, M., HARNAFI, H., NAPOLITANO, M., *Ocimum basilicum* ethanolic extract decreases cholesterol synthesis and lipid accumulation in human macrophages. **Fitoterapia**, vol. 79, no. 7-8 pp. 515–523, 2008.

BURNS, J., GARDNER, P. T., O’NEIL, J., CRAWFORD, S., MORECROFT, I., MEPHAIL, D. B., LISTER, C., MATTHEWS, D., MACLEAN, M. R., LEAN, M. E. J., DUTHIE, G. E CROZIER, A. Relationship Among Antioxidant Activity Vasodilation Capacity, And Phenolic Content Of Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.48, no.2, pp.220-230, 2000.

COLLINS, A. R., OSCOZ, A. A., BRUNBORG, G., GAIVÃO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C. C., STETINA, R., “The comet assay: Topical issues,” **Mutagenesis**, vol.23, no.3, pp.143-151, 2008.

CHOI, C.W., Et Al. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants And Flavonoids By Assay-Guided Comparison.**Plant Science**, vol. 163, no. 6, pp.1161-1168, 2002.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, A., "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress," **Clinica Chimica Acta**, vol. 329, no. 1-2, pp. 23–38, 2003.

DURASAMY, A., NARAYANASWAMY, N., SEBASTIAN, A., BALAKRISHNAN, K. P. Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants International. **Journal of Research in Cosmetic Science**, vol. 1, no. 1, pp. 13-16, 2011.

FANDOHAN, P., GNONLONFIN, B., LALEYE, A., GBENOU, J. D. DARBOUX, R., MOUDACHIROU, M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, no. 7, pp. 2493–2497, 2008.

FARNSWORTH, N. R. Et Al. Medicinal Plants In Therapy. **Bulletin Of The World Health Organization**. vol. 63, no. 6, pp. 965-981, 1985.

FENECH, M., "The *in vitro* micronucleus technique," **Mutation Research**, vol. 455, no. 1-2, pp. 81–95, 2000.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. WILLS': **Biochemical Basis Of Medicine**. 3. Ed. Oxford: Reed Educational And Professional Publishing Ltda, pp. 196-202, 1997.

GOLDSTEIN, S. L., LEUNG, J. C., SILVERSTAIN, D. M. "Pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic pediatric dialysis patients: Effect of aspirin," **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, vol 1, no. 5, pp. 979 –986, 2006.

GOMEZ-FLORES, R., VERÁSTEGUI-RODRÍGUEZ, L., QUINTANILLA-LICEA, R., TAMEZ-GUERRA, P., TAMEZ-GUERRA, R., RODRÍGUEZ-PADILLA, C., "In vitro rat lymphocyte proliferation induced by *Ocimum basilicum*, *Persea americana*, *Lantago virginica*, and *Rosa* spp. extracts," **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 2, no. 1, pp. 005-010, 2008.

GOYAL, M. M., BASAK, A., "Human catalase: Looking for complete identity," **Protein & Cell**, vol. 1, no. 10, pp. 888-897, 2010.

GRAYER, R. J., KITE, G. C., GOLDSTONE, F. J., BRYAN, S. E., PATON, A., PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, vol. 43, no. 5, pp. 1033–1039, 1996.

HADI, S. M., BHAT, S.H., AZMI, A.S., HANIF, S., SHAMIM, U. E ULLAH, M.F. Oxidative Breakage Of Cellular Dna By Plant Polyphenols: A Putative Mechanism Form Anticancer Properties. **Seminars in Cancer Biology**, vol 17, no. 5, pp.370-376, 2007.

HANASAKI, Y., OGAWA, S. E FUKUI, S. The Correlation Between Active Oxygens Scavenging And Antioxidative Effects Of Flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, vol.16, no.6, pp.845-850, 1994.

HUSSEIN, J.; TESHALE, C.; MOHAMMED, J. Assessment of the antimicrobial effects of some Ethiopian aromatic spices and herbs hydrosols. **International Journal of Pharmacology**, vol. 7, no. 5, pp. 635-640, 2011.

JAVANMARDI, J., KHALIGHI, A., KASHI, A., BAIS, H. P., VIVANCO, J. M. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, no. 21, pp. 5878–5883, 2002.

JAYASINGHE, C., GOTOH, N., AOKI, T., WADA, S., “Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum Basilicum* L.),” **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 51, no. 15, pp. 4442-4449, 2003.

KÉITA, S. M., VINCENT, C., SCHMIT J. P., ARNASON, J. T., BÉLANGER, A. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.). **Journal of Stored Products Research**. vol. 37, no. 4, pp. 339–349, 2001.

KELM, M. A., NAIR, M. G., STRASBURG, G. M., DEWITT, D. L., “Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn.,” **Phytomedicine**, vol. 7, no. 1, pp. 7-13, 2000.

KHAN, N. E MUKHTAR, H. Tea Polyphenols For Health Promotion. **Life Sciences**, vol.81, no.7, pp.519-533, 2007.

KWEE, E. M., NIEMEYER, E. D., Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, vol. 128, no. 4, pp. 1044–1050, 2011.

KOKO, W. S., MESAİK, M. A., YOUSAF, S., GALAL, M., CHOUDHARY, I. In vitro immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 118, no. 1, pp. 26–34 , 2008.

LABRA, M., MIELE, M., LEDDA, B., GRASSI, F., MAZZEI, M., SALA, F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, vol. 167, no.4, pp. 725–731, 2004.

LEE, J., SCAGEL, C. F. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**, vol. 115, no. 2, pp. 650–656, 2009.

LEE S. J., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties **Food Chemistry**, vol. 91, no. 1, pp. 131–137, 2005.

LIBER, Z., STANKO, K. J., POLITEOC, O., STRIKIC, F., KOLAKB, I., MILOSC, M., SATOVICB, Z. Chemical Characterization and Genetic Relationships among *Ocimum basilicum* L. Cultivars. **Chemistry & biodiversity**, vol. 8, no. 11, pp. 1978-1989, 2011.

LIU, X., CUI, C., ZHAO, M., WANG, J., LUO, W., YANG, B., JIANG, Y., “Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities,” **Food Chemistry**, vol. 109, no. 4, pp. 909-915, 2008.

MOLLER, J. K. S., MADSEN, H. L., ALTONEN, T., SKIBSTED, L. H., “Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants,” **Food Chemistry**, vol. 64, no. 2, pp. 215-219, 1999.

MUELLER, M., HOBIGER, S., JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, vol. 122, no. 4, pp. 987–996, 2010.

MUKHOPADHYAY, I., CHOWDHURI, D. K., BAJPAYEE, M., DHAWAN, A., “Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in drosophila melanogaster using the alkaline comet assay,” **Mutagenesis**, vol. 19, no. 2, pp. 85-90, 2004.

NGUYEN, P. M., NIEMEYER, E. D. Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, no. 18, pp. 8685–8691, 2008.

PETERSEN, M., SIMMONDS, M. S. J., “Molecules of interest: Rosmarinic acid,” **Phytochemistry**, vol. 62, no. 2, pp. 121-125, 2003.

PHIPPEN, W. B., SIMON, J. E. Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* L). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, no. 5, pp. 1734-1738, 1998.

RAKHA, P.; SHARMA, S.; PARLE, M. Anti-inflammatory potential of the seeds of *Ocimum basilicum* Linn. in rat. **Asian Journal of Bio Science**, vol. 5. no. 1, pp. 16-18, 2009.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 20, no. 7, pp. 933-956, 1996.

SAKR, S. A., AL-AMOUDI, W. M. Effect of leave extract of *Ocimum basilicum* on deltamethrin induced nephrotoxicity and oxidative stress in albino rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, vol. 2, no. 5, pp. 22-27, 2012.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N., "Analysis of condensed tannins: A review," **Animal Feed Science and technology**, vol. 91, no.1-2, pp. 21-40, 2001.

SHIGA, T., SHOJI, K., SHIMADA, H., HASHIDA, S. N., GOTO, F., YOSHIHARA, T. Effect of light quality on rosmarinic acid content and antioxidant activity of sweet basil, *Ocimum basilicum* L. **Plant Biotechnology Journal**, 26, pp. 255–259, 2009.

SOBOLEWSKI, C., CERELLA, C., DICATO, M., GHIBELLI, L.;DIEDERICH, M. "The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies," **International Journal Of Cell Biology** , vol. 2010, Article ID 215158, 21 pages, 2010.

THIRUGNANASAMPANDAN, R., JAYAKUMAR, R. Protection of cadmium chloride induced DNA damage by Lamiaceae Plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol 1, no. 5, pp. 391-394, 2011.

TSANG, A. H. K., & CHUNG, K. K. K., "Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica Et Biophysica Acta**, vol. 1792, no. 7, pp. 643-650, 2009.

VILLALOBOS, M. J. P., ACOSTA, M. C. B. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 31, no. 07, pp. 673-679, 2003.

WANG, S., KONOREV, E. A., KOTAMRAJU, S., JOSEPH, J., KALIVENDI, S., KALYANARAMAN, B., “Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms, intermediacy of H₂O₂ and P53- dependent pathways,” **Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, no. 24, pp. 25535-25543, 2004.

WHO/WPRO, “The regional strategy for traditional medicine in the western pacific (2011–2020),” Tech. Rep., World Health Organization Regional Office for the Western Pacific Region, Manila, Philippines, 2012.

YAMAMOTO, Y. Role Of Active Oxygen Species And Antioxidants In Photoaging. **Journal of Dermatological Science**, vol.27, no. 1, pp. 1-4, 2001.