

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA JÚLIA FRYDBERG CORRÊA ANGELONI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO
DE *MELISSA OFFICINALIS***

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA JÚLIA FRYDBERG CORRÊA ANGELONI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO
DE *MELISSA OFFICINALIS***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense –UNESC como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Vanessa Moraes de Andrade

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A584a Angeloni, Maria Júlia Fryberg Corrêa.

Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de melissa officinalis / Maria Júlia Frydberg Corrêa Angeloni; orientadora: Vanessa Moraes de Andrade. – Criciúma: Ed. do Autor, 2010.

72 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2010.

1. Erva-cidreira. 2. Toxicologia genética. 3. Farmacologia. I. Título.

Bibliotecária: Flávia Caroline Cardoso – CRB 14/840

Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC

À minha filha, meu marido e meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Alice, por toda força, apoio e carinho; ao meu marido Daniel por todo amor, atenção, dedicação e paciência e a Maria Paula minha filha, meu amor, minha amiga e companheira, por me compreenderem e me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas necessidades e decisões.

Agradeço ainda à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade, pelo empenho, e paciência, ajudando no meu crescimento profissional.

Às bolsistas do laboratório de Imunologia e Mutagênese que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa, Daniela Leffa, Natália Cassettari de Carvalho, Adriani Paganini Damiani e Giana Hainzenreder.

Agradeço, enfim ao corpo docente do programa de mestrado/doutorado – PPGCS pelo ensinamento.

Muito Obrigada!

“Determinação, coragem e auto confiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades, se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

Considerando que a alimentação representa uma grande influência sobre a promoção e a progressão do câncer, e que as mutações são elementos-chave em processos neoplásicos, há um interesse crescente no estudo de compostos com propriedades antigenotóxicas/antimutagênicas de extratos vegetais. *Melissa officinalis* L., que é popularmente conhecida no Brasil como erva-cidreira ou melissa é tradicionalmente utilizado como extrato aquoso ou alcoólico, para o tratamento de febres, constipações, indigestão associada com tensão nervosa, hipertireoidismo, depressão, insônia leve, epilepsia, dores de cabeça, dores de dente, entre outros, no entanto, não há nenhuma informação sobre esta planta em relação a efeitos protetores ou toxicogênicos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a antimutagenicidade/antigenotoxicidade e mutagenicidade/genotoxicidade do extrato aquoso e etanólico desta planta. A frequência de micronúcleos foi detectada usando o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos, e as lesões em nível de DNA foram detectadas pelo Ensaio Cometa. Estes testes foram escolhidos pois refletem danos mutagênicos e genotóxicos, respectivamente. Inicialmente, camundongos CF-1 machos receberam por gavagem extrato etanólico nas doses de 500 mg/kg e 250 mg/kg e o extrato aquoso na dose de 100 mg/kg de *M. officinalis*, a fim de detectar a atividade mutagênica e genotóxica dos mesmos. No entanto, nenhum aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em medula óssea ou lesão no DNA em leucócitos foi observado após o tratamento com ambos os extratos. Em contraste, o pré-tratamento com extrato etanólico de *M. officinalis*, mostrou diminuição significativa no dano em DNA induzido por Metil metanosulfonato, um agente alquilante. O padrão de redução variou entre 19% e 53% dependendo da concentração do extrato. Entretanto, os resultados das análises do extrato aquoso indicaram que esse tipo de extrato não diminui o dano no DNA induzido quimicamente por MMS. Os resultados do teste de MN em células da medula óssea de camundongos mostraram redução significativa na frequência de EPCMN induzidos pelo agente mutagênico MMS, somente na maior dose (500 mg/kg) do extrato etanólico. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o extrato etanólico de *M. officinalis* tem propriedade antigenotóxicas/ antimutagênicas e que o pré-tratamento diminui a indução de danos no DNA causado por um agente alquilante como o MMS.

Palavras-Chave: *Melissa officinalis*; Lamiaceae; Ensaio Cometa; Teste de Micronúcleos; Genotoxicidade; Antigenotoxicidade.

ABSTRACT

Considering that diet represents a major influence on the promotion and progression of cancer and that mutations are key elements in neoplastic processes, there is a considerable growing interest in plant extract compounds with antigenotoxic/antimutagenic properties. *Melissa officinalis* L. (lemon balm) that is popularly known in Brazil as erva-cidreira or melissa and is traditionally used as aqueous or alcoholic extracts for the treatment of fevers and colds, indigestion associated with nervous tension, hyperthyroidism, depression, mild insomnia, epilepsy, headaches, and toothaches among others. However, there is no information about the toxicogenetic or protective effects of the plant. Thus, the aim of the present study was to investigate the antimutagenicity/antigenotoxicity and mutagenicity/genotoxicity of aqueous and ethanolic *M. officinalis* extracts. The frequency of micronuclei detected using the bone marrow erythrocyte micronucleus test and level of DNA lesions detected by the Comet assay were chosen as end-points reflecting mutagenic and genotoxic damage, respectively. Initially, CF-1 male mice received ethanolic extracts as 250 mg/kg and 500mg/kg doses or aqueous extracts in 100mg/kg by gavage in order to detect mutagenic and genotoxic activity. However, no increase in the frequency of bone marrow micronucleated polychromatic erythrocytes (MN PCEs) or DNA lesion in leukocytes was observed after treatment with both extracts. In contrast, pre-treatment with ethanolic extract showed significant decreases in DNA damage induced by MMS an alkylant agent. The pattern of reduction ranged from 19% to 53%, depending on extract concentration. However, the analyses of aqueous extract indicated that this kind of extract did not diminish the DNA damage chemically induced by MMS. The Micronucleus test in bone marrow cells of mice showed significant decrease in the frequency of MMS-induced MNPCE only at the highest dose (500 mg/kg) of ethanolic extract. Taken together, our results suggest that ethanolic extract of *M. officinalis* have antigenotoxic/antimutagenic properties and that the pre-treatment diminishes the induction of DNA damage by an alkylant agent like MMS.

Key-words: *Melissa officinalis*; Lamiaceae; Comet assay; Micronucleus test; Genotoxicity; Antigenotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DPPH - 2,2 Difenil - 1 - picrilidrazila

ENC - Eritrócito Normocromático

EPC - Eritrócito Policromático

EPCMN - Eritrócito Policromático Micronucleado

FD - Frequência de Dano

ID - Índice de Dano

MMS - Metil metanosulfonato

MN - Micronúcleo

RNA - Ácido Ribonucléico

RNAm - RNA mensageiro

SCGE - Single Cell Gel Eletrophoresis Assay

TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances

SUMÁRIO

PARTE I

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Plantas Medicinais	10
1.2 <i>Melissa officinalis</i>	11
1.3 Composição fitoquímica da <i>Melissa officinalis</i> e propriedades biológicas.....	12
1.4 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade	15
1.5 Testes genéticos para a avaliação de danos no DNA	18
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24

PARTE II

3. ARTIGO CIENTÍFICO: Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potencial of <i>Melissa officinalis</i>	25
--	----

PARTE III

4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
5. REFERÊNCIAS	63

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais e suas formas derivadas (extratos, xaropes, etc.) constituíram durante séculos a base da medicina terapêutica. O emprego correto de plantas para estes fins pela população em geral, requer o uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêutica, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais (Lorenzi & Matos, 2002).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais teve origem na cultura dos diversos grupos indígenas, como por exemplo, o jaborandi (*Pilocarpus spp*) e o guaraná (*Paullinia cupana*). Muitas outras foram trazidas pelos europeus, como a camomila (*Matricaria chamomila*) a malva (*Malva sylvestris*) e a melissa (*Melissa officinalis*); ou ainda aproveitadas de culturas de outros países sul-americanos, como o boldo (*Peumus boldus*) (Simões et al., 1998).

O uso de infusões de plantas para curar diferentes tipos de doenças é muito comum na medicina popular brasileira, substituindo muitas vezes a medicina moderna. Contudo, nem todas as espécies são inofensivas à saúde humana, podendo apresentar substâncias tóxicas e/ou mutagênicas na sua composição fitoquímica (Bresolin & Vargas, 1993; Sá Ferreira & Vargas, 1999; Fernandes & Vargas, 2003). Por outro lado, uma ação protetiva de certos compostos fitoquímicos sobre o material genético também tem sido relatada, seja por ajudar no sistema de reparo das células ou na preservação da sua integridade (Yen & Chen, 1996; Horn & Vargas, 2003).

A planta medicinal só pode ser considerada um medicamento quando usada corretamente, podendo assim ser incluída na farmacopéia. Para isso são

necessários diversos estudos, desde os farmacológicos, pré-clínicos e toxicológicos até o estudo químico, visando o isolamento e a caracterização do princípio ativo (Lorenzi & Matos 2002).

A diversidade de espécies de plantas no Brasil é uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos, cujos efeitos na saúde humana ou no material genético são muitas vezes desconhecidos. Recentemente interesses em compostos terapêuticos planta-específicos têm sido reforçados devido aos conhecimentos de que químicos, como proteases e antioxidantes, podem prevenir ou reduzir o desenvolvimento de câncer por bloquearem o dano genético (Berhow et al., 2000; Hernández-Ceruelos et al., 2002; Souza et al., 2004).

Sabe-se que no Brasil as preparações usuais de plantas medicinais são os chás ou infusões (Lorenzi & Matos, 2002); no entanto, pouco se sabe a respeito do possível papel antígeno-tóxico destas plantas ingeridas desta forma.

Dessa forma, este projeto visa avaliar o potencial genotóxico e antígeno-tóxico da *Melissa officinalis*.

1.2 *Melissa officinalis*

Melissa officinalis L. (Figura 1), também conhecida como erva-cidreira, é uma planta usada como aromatizante de alimentos e para fins medicinais. No Brasil existem inúmeros nomes populares referentes à *Melissa officinalis*, tais como cidreira, melissa e bálsamo, este último derivado do nome popular na língua inglesa "lemon balm". Trata-se de um arbusto perene, pertencente à família Lamiaceae, de aproximadamente um metro de altura, que tem origem na região do Mediterrâneo, leste da Ásia, sudeste da Sibéria e Norte da África, mas que se difundiu por todo o mundo, com boa adaptação (Carnat et al., 1998; Dastmalchi et al., 2007). As suas folhas e inflorescências são empregadas na forma de chá como calmante nos casos de ansiedade e insônia, e também utilizada contra cefaléias, enxaqueca, problemas digestivos, dores de origem reumática e para normalizar as funções gastrintestinais (Simões et al., 1998; Lorenzi & Matos, 2002).

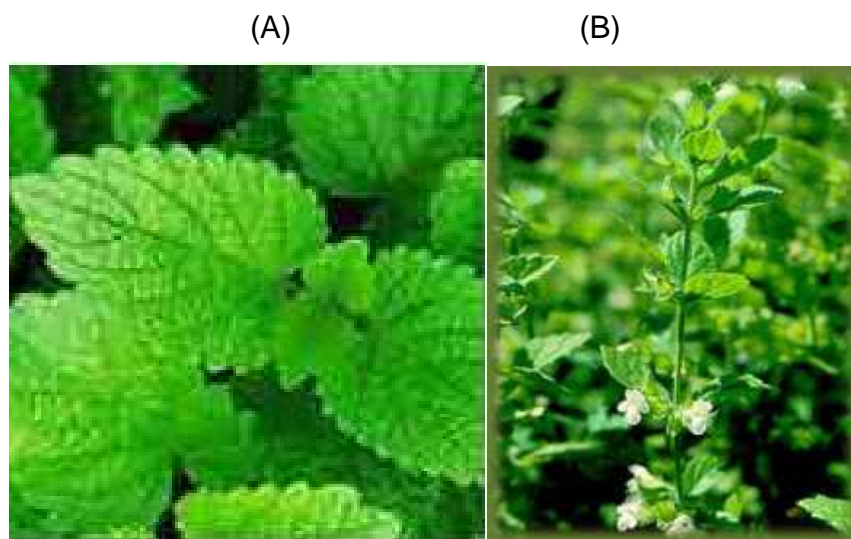


Figura 1. Folhas (A) e flores (B) de *Melissa officinalis*. (Fonte: www.jardimdeflores.com.br e www.raizculturablog.files.wordpress.com)

Os efeitos cientificamente comprovados são: antioxidante (Carnat et al., 1998; Ribeiro et al., 2001; Pereira et al., 2009), sedativo (Kennedy et al., 2003; Muller & Klement, 2006), antiinflamatório intestinal, hepatoprotetor, digestivo (Simmen et al., 2006; Schemann et al., 2006), antibacteriano, antifúngico, antiviral (especialmente contra o *Herpes simplex*), anti-histamínico (Carnat et al., 1998; Sandraei et al., 2003; Allahverdiyev et al., 2004), redutor da motilidade gastrointestinal, redutor do colesterol (Bolkent et al., 2005), redutor do estresse e da agitação (Santos-Neto et al., 2006), eficácia no controle da demência em casos leves a moderados de Alzheimer (Aklhodzadeh et al., 2003; Ferreira et al., 2006) e atividade antinociceptiva e antiinflamatória em camundongos e ratos (Gugisnki et al., 2009).

1.3 Composição fitoquímica da *Melissa officinalis* e propriedades biológicas

Entre os inúmeros compostos que foram isolados a partir do extrato de *Melissa officinalis*, os mais importantes são os compostos polifenólicos (ácido rosmarínico e ácido cafeico), óleos essenciais (cital), aldeídos monoterpenóides, sesquiterpenos, flavonóides (luteolina) e taninos (Carnat et al., 1998; Heitz et al.,

2000; Kennedy *et al.*, 2003; Ziaiková *et al.*, 2003; Gazola *et al.*, 2004; Bolkent *et al.*, 2005; Salah & Jäger, 2005; Dastmalchi *et al.*, 2007).

Seu óleo essencial submetido a ensaios farmacológicos demonstrou ser um bom agente antibacteriano e antifúngico (Mimica-Dukic *et al.*, 2004) e é também, o responsável pela propriedade ansiolítica atribuída a esta planta (Pereira *et al.*, 2005). Alguns trabalhos da literatura têm sugerido propriedades antioxidantes e antitumorais da melissa, trabalhos estes também relacionados aos seus componentes principais e não a extratos ou infusões (Souza *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2005).

Nos últimos anos vem ocorrendo um crescente interesse nos compostos fenólicos, uma vez que estes apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas benéficas, tanto em humanos, como em outros animais, principalmente quando se trata dos polifenóis, incluindo as ações antitumorais, antiinflamatórias e hepatoprotetoras. Dentre as diversas espécies vegetais que apresentam elevados níveis de compostos fenólicos com bioatividade, a família Lamiaceae possui várias espécies que vêm despertando interesse por seus efeitos terapêuticos, sendo que *Melissa officinalis* apresenta elevados níveis destes compostos com propriedades antioxidantes. Dentre as atividades biológicas descritas para os compostos fenólicos, existem relatos dos efeitos hepatoprotetor, nefroprotetor e nas propriedades antiinflamatórias, atribuídas à ação antioxidante deste grupo de moléculas (Müzzel, 2006).

Os flavonóides constituem o maior grupo dos compostos fenólicos, sendo descritos mais de 8.000 compostos. Estes são pigmentos responsáveis pelas cores amarelas, laranjas e vermelhas das flores, sendo importantes para o desenvolvimento e para defesa das plantas (Rice-Evans, 2003).

As vias pelas quais os flavonóides agem como agentes quimiopreventivos podem apresentar três distintos mecanismos: (1) prevenção da ativação metabólica carcinogênica; (2) prevenção da proliferação de células tumorais pela inativação ou baixa regulação de enzimas pró-oxidantes ou transdução de sinal de enzimas; e, (3) indução da morte celular tumoral, apoptose (Spencer *et al.*, 2004).

Ácidos orgânicos são substâncias que em sua estrutura molecular

apresentam um ou mais grupos carboxila, conferindo um sabor ácido à planta. Muitos deles são considerados agentes antioxidantes e regeneradores celulares (Alonso, 2008). O ácido rosmarínico é o composto majoritário presente no extrato etanólico de *Melissa officinalis*, estima-se que esteja presente em uma concentração de 2–5 % (Carnat et al., 1998). Segundo Pereira e colaboradores (2005), o ácido rosmarínico está presente em muitas outras plantas, como por exemplo, *Artemísia capillaris*, *Calendula officinalis*, e *Salvia officinalis* além de plantas de outras famílias. Algumas atividades biológicas têm sido descritas para o ácido rosmarínico; como, propriedades antivirais, antibactericidas, antiinflamatórias, antimutagênicas e antioxidantes. Segundo os mesmos autores, o ácido rosmarínico pode ser usado como ansiolítico, além de ter sido avaliado pelo ensaio cometa e não ter tido efeito genotóxico sobre o DNA no tecido cerebral e sangue periférico. (Pereira et al., 2005)

O ácido rosmarínico é rapidamente eliminado da circulação sangüínea e apresenta uma toxicidade muito baixa em camundongos. Este composto apresenta tanto ação adstringente, antioxidante e antiinflamatória, inibindo as lipooxigenases e ciclooxigenases, quanto, ações antibacteriana, antiviral e efeito antimutagênico (Petersen & Simmonds, 2003; Pereira, et al., 2005;).

A respeito das propriedades antigenotóxicas da *M. officinalis*, até o presente momento nenhum dado foi publicado na literatura. Somente Pereira e colaboradores (2005) trabalhando com o ácido rosmarínico demonstraram que em baixas doses, este composto não foi capaz de causar danos no DNA de cérebro de ratos expostos.

Vale ressaltar ainda que muitos estudos consideram apenas os efeitos de fitoquímicos isolados e de misturas totais em testes *in vitro*. Na maioria dos casos a ação antimutagênica atribuída a algumas plantas deve-se na verdade a alguns compostos presentes nelas, principalmente flavonóides (Czeczot & Kusztelek, 1993; Hernandez-Ceruelos et al., 2002; Gomes-Carneiro et al., 2005). Contudo, existem poucos dados referentes à ação de misturas complexas como infusões ou sucos de vegetais e frutas. É de grande importância considerar as misturas complexas, uma vez que, é a forma predominante de ingestão em seres humanos.

Estes estudos controversos de Pereira, 2005 de genotoxicidade e ação anticarcinogênica de flavonóides e de extratos de plantas, compostos por muitos químicos, justificam o presente estudo, onde se pretende elucidar os mecanismos e as condições que mediam os efeitos biológicos dos extratos de *M. officinalis* antes de considerá-lo um agente terapêutico.

1.4 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

A genotoxicidade é o setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura física-química, o DNA (Ácido desoxirribonucléico), processo esse classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético em nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (Erdtmann, 2003)

A mutação é definida como sendo qualquer alteração do DNA, ou seja, o sistema mutacional é desagregador em princípio, mas também é provedor de variabilidade para a seleção. As mutações propriamente ditas são classificadas em gênicas e cromossômicas. As gênicas referem-se a mudanças de uma ou poucas sub-unidades, os quatro nucleotídeos, do polímero do DNA, por substituição, perda ou ganho destas sub-unidades; isto altera geralmente apenas o funcionamento de um gene. Nas mutações cromossômicas não haveria uma alteração na composição dos nucleotídeos, mas uma reorganização na estrutura dos polímeros de dupla hélice do DNA – os cromossomos, por translocação, inversão ou mesmo ganho ou perda de parte maior destes cromossomos. Podemos notar, que eventualmente a mutação gênica e cromossômica, podem se sobrepor, como por exemplo, uma translocação pode destruir a estrutura de um gene. Pode também alterar a regulação de genes sem alterar a composição das sub-unidades do DNA, por efeito de posição. Das mutações pode decorrer uma série de problemas, na grande maioria das vezes os resultados das mutações são maléficos, incluem malformações, câncer, envelhecimento e morte. Mas também das mutações decorre a maravilhosa variabilidade dos seres, em todas as suas

expressões (Erdtmann, 2003)

O DNA (ácido desoxirribonucléico) para exercer sua função, necessita interagir com outras moléculas, essencialmente proteínas para poder ser transcrito e duplicado, cada etapa representa um risco de erro, sendo que tais erros podem ocorrer naturalmente. O DNA é um arquivo de informações, enquanto o RNA (ácido ribonucléico) transfere tais informações para que ocorra a tradução de proteínas, a partir de aminoácidos. Se ocorrer uma alteração na molécula de DNA pode haver uma mudança nos aminoácidos, o que transformaria a receita da proteína pré-determinada pelo material genético, deixando-a menos eficaz ou totalmente ineficaz (Erdtmann, 2003).

Todos os organismos têm a capacidade de detectar e corrigir mutações que ocorrem no seu material genético. Para controlar os erros estão de prontidão sistemas de reparo do DNA. Já se tem relatos, hoje em dia, de produtos e químicos que reduzem ou previnem as mutações, sendo chamados de agentes antimutagênicos ou antigenotóxicos (Saffi & Henriques, 2003).

O termo “antimutagênico” foi usado originalmente por Novick e Szilard em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido (Von Borstel et al., 1996). Os agentes que previnem o câncer podem ser incluídos em duas categorias principais: os que previnem a iniciação do processo carcinogênico, por meio de bloqueio das mutações (agentes antimutagênicos ou bloqueadores) e os que interferem sobre a promoção ou a progressão das lesões que foram previamente fixadas (agentes supressores ou anticarcinogênicos). Entretanto, Andrade e colaboradores (2003) sugerem que a quimioprevenção no controle do câncer depende da obtenção de agentes que não atuem apenas como antimutagênicos, mas que tenham a capacidade adicional de alterar os padrões de expressão gênica.

Kada e colaboradores (1978) classificaram os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos em dois processos, denominados de desmutagênese e bioantimutagênese. Na desmutagênese, os agentes antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os

química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os agentes antimutagênicos atuam sobre o processo de fixação das mutações, ou no reparo das lesões causadas no DNA.

De Flora e Ramel (1988), propuseram uma classificação dos inibidores de mutagênese e carcinogênese em três níveis de prevenção, considerando o modo de ação dos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, assim como o ambiente de ação, extra ou intracelular. A prevenção primária inibe a mutação e a iniciação do câncer, tanto pelo ambiente externo quanto interno da célula. A prevenção secundária considera os vários mecanismos que inibam a progressão do tumor à condição de malignidade. A prevenção terciária refere-se à inibição das metástases.

Os mecanismos extracelulares envolvidos na prevenção de mutágenos e/ou carcinógenos são: inibição da penetração ou remoção do agente do organismo; inibição da formação endógena de mutágenos; formação de complexo inativo, diluição e/ou desativação do mutágeno/carcinógeno; favorecimento da absorção de agentes protetores. Entre as vias envolvidas na inibição de mutação e iniciação do câncer por mecanismos celulares, podemos citar: desintoxicação celular; modificação no transporte trans-membrana; modulação do metabolismo celular; inibição da replicação celular; modulação no sistema de reparo do DNA; controle da expressão gênica (De Flora, 1998). A modulação de apoptose também é um importante mecanismo de ação dos agentes quimiopreventivos (Ferguson, 2005).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos (*in vivo* e/ou *in vitro*), incluindo os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Outros mecanismos, como bactérias e fungos, também são usados na avaliação do potencial antimutagênico (Antunes & Araújo, 2000; Rodrigues et al., 2003; Rezende et al., 2004).

Avaliar o papel antigenotóxico de extratos de plantas, de infusões e dos principais componentes fitoquímicos é de suma importância, visto que substâncias antimutagênicas presentes em algumas plantas já mostraram ajudar na prevenção

de câncer e outras doenças (Nishino, 1998; Berhow et al., 2000, Surh & Ferguson, 2003, Patel et al., 2007). Assim, estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade podem ajudar a avaliar a segurança e a efetividade de muitas plantas utilizadas na medicina popular.

1.5 Testes genéticos para avaliação de danos em DNA

1.5.1 Teste do Micronúcleo

Os testes citogenéticos *in vitro* e *in vivo*, juntamente com os testes de mutação gênica em bactérias (teste de Ames) e em células de mamíferos têm fornecido informações primárias fundamentais para o estabelecimento do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos, bem como, do potencial antimutagênico de muitos compostos naturais. O estudo de danos no DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da Genética Toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese (Albertini et al., 2000).

O teste de Micronúcleos em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendadas para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (Hayashi et al., 1994). É um dos testes mais importantes implementados por entidades de diferentes países para avaliar mutagenicidade e sensibilidade a xenobióticos (Abrevaya et al, 2004)

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MN podem também ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo (Ribeiro, 2003).

Este ensaio apresenta algumas vantagens em relação aos outros, entre as quais podem ser citadas sensibilidade, baixo custo e confiabilidade. Este teste pode ser executado praticamente em qualquer população de células que esteja em constante divisão, sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões mais adequadas, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (Heddle, 1991).

A medula óssea é um tecido bastante favorável para avaliações citogenéticas, especialmente em células da linhagem eritrocitária, pois apresenta diversas vantagens: (a) a intensa atividade mitótica em suas células (eritropoiese), o que as torna altamente suscetíveis de sofrerem danos genéticos (Marvournin et al., 1990); (b) duração relativamente curta e ciclo preciso. Os eritroblastos da medula óssea expõem o núcleo principal após 6 horas do final da mitose e havendo micronúcleos, estes permanecem nos eritrócitos (Marvournin et al., 1990; Heddle et al., 1991); (c) os micronúcleos são estruturas facilmente detectáveis, principalmente quando a análise é realizada em células anucleadas; (d) os micronúcleos ficam distribuídos de forma bem definida e sua frequência em eritrócitos policromáticos é dependente do tempo de amostragem (Ribeiro, 2003).

Basicamente, no teste de micronúcleo em medula óssea de roedores, os animais são tratados com o agente químico a ser testado, usualmente por injeção intraperitoneal ou por gavagem oral, embora outras rotas possam ser utilizadas. Após a obtenção do material da medula óssea, esfregaços são preparados em lâminas de microscopia, secos ao ar, fixados em metanol absoluto e corados com um corante apropriado. A técnica permite a distinção entre eritrócitos policromáticos (EPC) ou eritrócitos jovens, que durante o período de 10 a 24 horas são RNA positivos e coram-se em roxo e eritrócitos normocromáticos (ENC) ou eritrócitos maduros, que se coram em tons de laranja (corante de Giemsa) (Fig. 2). As frequências de micronúcleos são determinadas em eritrócitos policromáticos (EPC). Além da avaliação da frequência de EPC micronucleados, a porcentagem de EPC no total de eritrócitos (ou a taxa de EPC/ENC) é determinada com o objetivo de avaliar a toxicidade (Ribeiro, 2003).

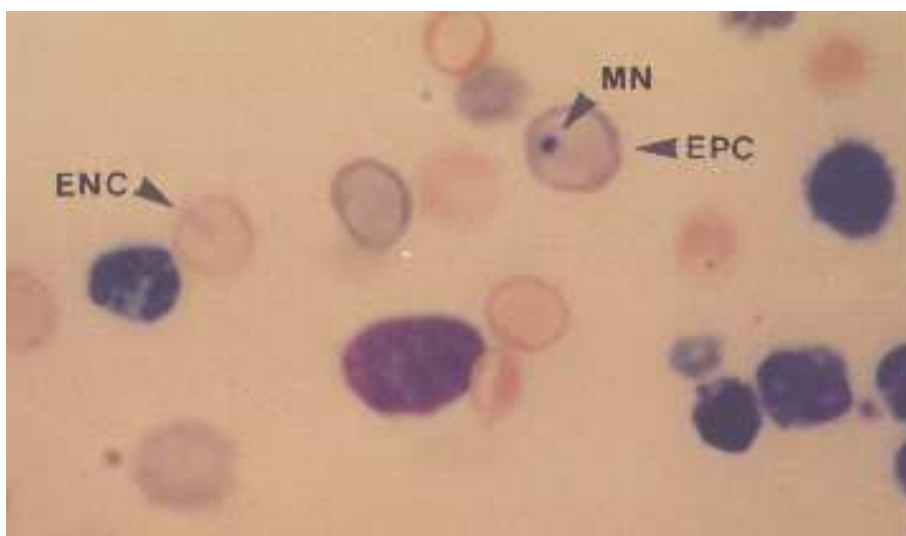


Figura 2. Eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de camundongos. ENC: Eritrócito Normocromático; EPC: Eritrócito Policromático; MN:micronúcleo. (Fonte: autor)

Resultados positivos no teste de micronúcleos indicam que a substância em estudo induz dano cromossômico estrutural e/ou numérico nos eritroblastos da espécie em estudo e fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada (Hartmann & Speit, 1999; Singlh, 2000; Nadin et al., 2001; Picada et al., 2003). O potencial clastogênico (agentes que quebram cromossomos) da substância teste é medido pela sua habilidade em aumentar a frequência de EPCMN em animais tratados, quando comparados ao grupo controle negativo (Ribeiro, 2003). Os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo*, avaliando-se o sistema testado (Macgregor et al., 1987; Mavournin et al., 1990 Heddle et al., 1991; Hayashi et al., 1994; Salamone et al., 1994).

Semelhante frequência de micronúcleos, induzida pela substância teste ao do controle indica que não há indução de mutações cromossômicas em eritrócitos policromáticos da medula óssea. Em adição uma similar razão EPC/ENC nos grupos tratados com a substância teste com o grupo controle, indica que a substância testada não foi tóxica para a medula óssea dos animais. Assim, quando a substância for tóxica para a medula do animal observa-se uma diminuição significativa da relação EPC/ENC (Ribeiro, 2003).

1.5.2 Ensaio Cometa

O Teste cometa ou SCGE (Single Cell Gel Eletrophoresis Assay) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este pode ser realizado tanto em animais como em plantas, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade (Silva et al., 2003). Apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, como: (a) versatilidade em relação ao tipo de célula a ser analisada, sendo que o método já foi adaptado a qualquer tipo de célula, além de ser aplicado a diversos organismos; (b) necessidade de somente um pequeno número de células; (c) não ser necessário células em divisão. Pode ser usado em testes *in vitro* e *in vivo* de indução de danos ao DNA (Collins et al., 1997; Tice et al., 2000; Sekihashi et al., 2002; Valverde et al., 2002; Juchimiuk et al., 2006). A elevada praticidade e o baixo custo deste teste em relação a outros determinam a ampla aplicabilidade como um teste de avaliação da genotoxicidade (Cotelle & Féraud, 1999; Garcia et al., 2004).

O Ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade na detecção de dano no DNA; a coleta de dados em nível de célula individual; o uso de um número pequeno de células para a análise e a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas; e principalmente a rapidez de resultados (importante para diagnósticos clínicos) (Burlinson et al., 2007).

O Ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o Ensaio Cometa pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de

lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (Albertini et al., 2000).

A técnica do Ensaio Cometa consiste em obter, a partir de células individualizadas, colocadas em agarose, lisadas, submetidas a eletroforese e coradas, uma matriz com um halo fluorescente, formado por DNA não danificado e que não migrou. Células com DNA danificado formam um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão do DNA que migrou está correlacionado com o dano ocorrido (Tice et al., 2000).

A identificação das lesões no DNA é realizada através da identificação visual em 5 diferentes classes (de 0 a 4), onde 0 representa células sem danos enquanto as classes de 1 a 4 representam níveis de danos crescentes (Fig. 3). Desta forma obtem-se um valor arbitrário, definido como índice de danos (ID), que expressa a genotoxicidade geral da população de células. O índice de dano é calculado somando-se o número de células em cada classe multiplicado pelo valor atribuído de cada classe (0 a 4) na qual foram incluídas. Assim este índice pode variar de 0 (sem dano, 100 células x 0) a 400 (dano máximo, 100 células x 4) (Collins et al., 1997; Tice et al., 2000). Os núcleos intactos aparecem redondo, enquanto que nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma “cauda” de fragmentos semelhantes a um cometa.

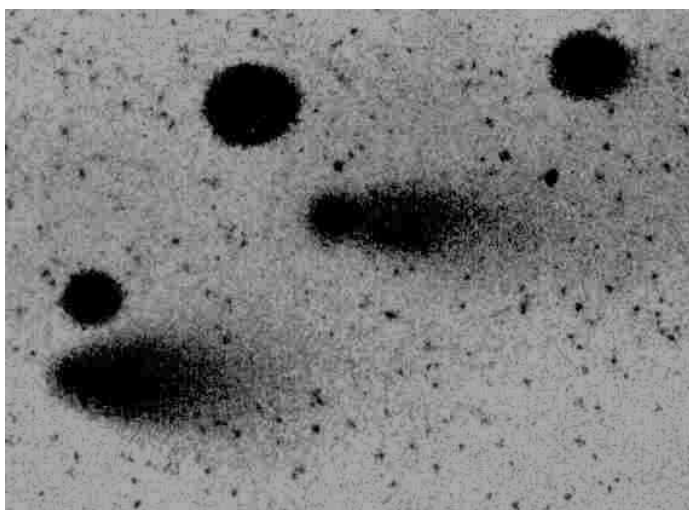


Figura 3. Visualização no microscópio de linfócitos com vários tipos de dano, onde a “cabeça” representa o núcleo original e a “cauda” os fragmentos de DNA. (Fonte: autor)

A Freqüência de Danos (FD em %) é calculada em cada amostra com base no número de células com cauda versus células sem cauda.

Existem basicamente dois tipos de protocolos para o Teste Cometa: (a) tratamento neutro, que detecta quebra dupla no DNA; e (b) tratamento alcalino, que detecta quebras simples e duplas de cadeia, diretas ou induzidas por lesões nas bases do DNA (como oxidação, metilação ou outros adutos), cujo procedimento transforma essas anomalias em lesões álcali-lábeis (Fairbairn et al., 1995).

Dessa forma, considerando o forte uso terapêutico da Melissa (*Melissa officinalis*) no trato das mais diversas afecções, principalmente no sul do Brasil, o presente projeto tem por objetivo verificar o comportamento em nível de danos de DNA dos extratos hidroalcoólicos e infusões de *Melissa officinalis*. E ainda, analisar se estes mesmos extratos e/ou infusões podem modular a ação do agente sabidamente genotóxico como o metil metanosulfonato (MMS) *in vivo* em células de camundongos, através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos. Buscando dessa forma, fornecer informações quanto à segurança e efetividade das infusões e/ou extratos desta planta medicinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* a capacidade genotóxica e antigenotóxica do extrato de *Melissa officinalis* através dos danos causados pelo agente alquilante metil metanosulfonato (MMS).

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a genotoxicidade da *Melissa officinalis* em ensaios *in vivo* utilizando Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos em camundongos.

b) Investigar a capacidade antigenotóxica de 2 concentrações diferentes de extrato etanólico de *M. officinalis*, bem como do extrato aquoso desta mesma planta usando o Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos.

c) Comparar os resultados obtidos através dos dois testes diferentes, de forma a fornecer maior segurança em relação aos resultados e da indicação terapêutica desta planta.

PARTE II**ARTIGO CIENTÍFICO****EVALUATION OF THE GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF***Melissa officinalis*

Natália Cassettari de Carvalho¹, Maria Júlia Frydberg Corrêa-Angeloni¹, Daniela Dimer Leffa¹, Jeverson Moreira², Vanessa Nicolau², Patrícia de Aguiar Amaral², Ângela Erna Rossatto², Vanessa Moraes de Andrade¹

**Artigo a ser enviado para a revista Journal of Agricultural and Food
Chemistry**

Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* L
(Lamiaceae)

Natália Cassettari de Carvalho¹, Maria Júlia Frydberg Corrêa-Angeloni¹, Daniela Dimer Leffa¹, Jeverson Moreira², Vanessa Nicolau², Patrícia de Aguiar Amaral², Ângela Erna Rossatto², Vanessa Moraes de Andrade^{1,*}

¹Laboratório de Imunologia e Mutagênese - LABIM, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) – Criciúma, SC – Brasil.

²Laboratório de Estudos Etnofarmacológicos - G-FITO, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) – Criciúma, SC – Brasil.

*Corresponding author, phone: +55 48 3431-2757 E-mail address: vmoraesdeandrade@yahoo.com.br – Av. Universitária, 1105 (UNESC), Bairro Universitário, CEP: 88806-000, Criciúma, SC - Brazil

Abstract

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) is traditionally used as aqueous or alcoholic extracts for the treatment of various diseases. However, there is no information about the toxicogenetic or protective effects of the plant. Thus, the aim of the present study was to investigate antimutagenicity /antigenotoxicity and mutagenicity/genotoxicity of ethanolic (250 mg/kg and 500mg/kg doses) and aqueous (100 mg/kg) *M. officinalis* extracts in CF-1 male mice using the Comet assay (peripheral blood) and micronucleus test (bone marrow). We found that neither extract of this plant showed any genotoxic or mutagenic properties. In contrast, the Comet assay showed that the ethanolic extract significant decreases DNA damage by alkylating agent (MMS), different of aqueous extract that did not diminish the DNA damage. The micronucleus test showed a significant decrease in the frequency of MMS-induced micronucleated polychromatic erythrocytes (bone marrow), only at the highest dose of ethanolic extract. Our results suggest that the ethanolic extract of *M. officinalis* have antigenotoxic/antimutagenic properties.

Key-words: *Melissa officinalis*; Lamiaceae; Comet assay; Micronucleus test; Genotoxicity; Antigenotoxicity.

1. INTRODUCTION

Medicinal plants and their derived forms (extracts, syrups, etc.) have constituted the basis of medical therapy for centuries. Medicinal plants have been traditionally used in the treatment of several human diseases, and their pharmacological and therapeutic properties have been attributed to different chemical constituents isolated from their crude extracts (1). The correct use of plants by the general population requires the use of medicinal plants selected for their efficacy and safety, based on folk tradition or validated scientifically (2). The use of herbal infusions to cure different types of diseases is very common in Brazilian folk medicine, and frequently replaces modern medicine. The diversity of plant species in Brazil is a potential source of biologically active compounds whose effects on human health or the genetic material are often unknown. However, not all species are harmless to human health, and some may present toxic and/or mutagenic substances in their phytochemical composition (3-5). On the other hand, a protective action of phytochemical compounds on genetic material has been reported, leading to its repair or to preserving its integrity (5-7). Interest in such popular practices has recently gained strength, due to the knowledge that chemicals such as proteases and antioxidants may prevent or reduce the development of cancer by blocking genetic damage (6-8).

Originally native to the Eastern Mediterranean region and Western Asia, *Melissa officinalis* L. (lemon balm) (Lamiaceae) is also found in tropical countries (Brazil), where it is popularly known as erva-cidreira and/or melissa (7). Aqueous

and alcoholic extracts with the aerial part of *Melissa officinalis* are traditionally used for the treatment of fevers and colds, indigestion associated with nervous tension, hyperthyroidism, depression, mild insomnia, epilepsy, headaches, and toothaches among others (9-12). In addition, the antioxidant activity of *M. officinalis* has been described by some authors (7,13,14).

Phytochemical studies carried out with *M. officinalis* have demonstrated the occurrence of many classes of constituents, including polyphenolic compounds (rosmarinic acid, caffeic acid and protocatechuic acid), essential oils (citral), monoterpenoid aldehydes, sesquiterpenes, flavonoids (luteolin) and tannins (9,15). Pharmacological investigations on its essential oil revealed that it is a good antibacterial and antifungal agent (13), being also responsible for the anxiolytic property attributed to this plant (16). The current literature suggests antioxidant and antitumoral properties of lemon balm, in works that also addressed its core components, but not the extracts or infusions *per se* (1,7).

It is worth emphasizing that many studies consider only the effects of isolated phytochemicals and complete mixtures in *in vitro* tests. In most cases the antimutagenic action attributed to some plants is in fact due to some compounds present in them, mainly flavonoids (8,17,18). However, the data concerning the action of complex mixtures such as teas or juices of vegetables and fruits are scarce. It is of great importance to consider the complex mixtures, since these are the predominant form of intake. Thus, considering the strong therapeutic use of *Melissa officinalis*, mainly in southern Brazil, this project aims at investigating the mutagenic and genotoxic activity of aqueous and ethanolic extracts of *M. officinalis*, utilizing the Micronucleus Test and the Comet assay. In the absence of

mutagenic and/or genotoxic activity for the extracts of *M. officinalis*, its antimutagenic potential was also investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Identification of plant material and Extract Preparation

Aerial parts of *M. officinalis*, family Lamiaceae, were collected in Grão Pará, SC, Brazil in September 2008. A voucher specimen (number CRI 7380) of *M. officinalis* was deposited at Herbarium Pe. Dr. Raulino Reitz, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil. The aerial parts were allowed to dry under air circulation (40°C) for 3 days.

The ethanolic extract was obtained according to the methodology proposed by Brazilian Pharmacopoeia (19). The ethanolic extract was prepared by soaking 200 g of the dried pharmacogen (ground in a knife mill) in 1000 mL of solvent (water-alcohol solution of ethanol 45%) for about 15 days at room temperature, protected from light, with occasional agitation (once a day) and no renewal of liquid extractor. After, the liquid was strained with the aid of gauze and then filtered on filter paper, and completed the volume to 1000 mL with the same solvent. Then, the extract was evaporated to dryness under reduced pressure. This dry extract was then diluted in water to give two different doses to be tested (250 and 500 mg/kg) (20). The aqueous extract was obtained by infusion of 0.6 g of dry pharmacogen in 20 mL of distilled hot water, just before use. The dose of the aqueous extract (100 mg/kg) was based on the calculation of total solids.

2.2 Phytochemical screening

The phytochemical analysis (flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids, saponins, coumarins and cardiac glycosides) of the aerial parts of *M.officinalis* was

carried out according to the methods described by Harborne (21). The thin layer

chromatography analyses were performed following systems and developers indicated by Wagner and Bladt (22), and the aluminum chloride colorimetric method was used for flavonoids quantitative determination (19). Each plant extracts (0.5 mL of 1:10 g) in methanol were separately mixed with 1.5 mL of methanol, 0.5 mL of 2% aluminum chloride, 0.1 mL of 1 M potassium acetate and 2.8 mL of distilled water. It remained at room temperature for 30 min; the absorbance of the reaction mixture was measured at 425 nm with biospectro Model SP-22 UV/Visible spectrophotometer.

2.3 Animals and chemical treatment

CF-1 male mice (weighing 40 - 50g) were obtained from the breeding colonies of the University of Southern Santa Catarina, UNESC, Criciúma, SC, Brazil. The animals were kept in plastic cages in an experimental room under controlled conditions of temperature (22 ± 2) °C, humidity (55 ± 10) %, 12-h light/dark cycle and with *ad libitum* access to diet and water. The animals were randomized at the beginning of the experiment. The study design was approved by the Animal Ethical Committee of UNESC (protocol number 043/2008) and the experiments were conducted in accordance with the ethical principles of the Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA. The mice were divided into 7 groups, with 5 animals per group.

Methyl methanesulfonate (MMS; Sigma-Aldrich), a monofunctional sulfur-containing compound commonly used as a solvent and as a catalyst for polymerization, alkylation and esterification reactions (23), was used to induce

mutations and DNA damage for the antimutagenic/antigenotoxic evaluations. MMS was diluted in 0.9% NaCl just before use. The route of exposure was by

intraperitoneal (ip) injection (40 mg/kg b.w.).

2.4 Experimental design

The evaluation of DNA damage or protection by the aqueous and ethanolic extracts of *M. officinalis*, were performed according the protocol developed by Azevedo et al. (24) with adaptations as follows (Fig 1): In group 1, mice received only distilled water (10 mL/kg b.w. per day by gavage) for 2 weeks prior to treatment with 0.9% NaCl by intraperitoneal (i.p.) injection. Group 2 also received distilled water (10 mL/kg b.w. per day by gavage) for 2 weeks, but the mice were treated on day 15 with MMS (40 mg/kg b.w.). Groups 3 and 4 received *M. officinalis* ethanolic extract administered orally (10 mL/kg b.w. per day by gavage) prepared as two different doses: 250 mg/kg (group 3), 500 mg/kg (group 4), for 2 weeks prior to treatment with MMS. Group 5 received only *Melissa officinalis* ethanolic extract administered orally (500 mg/kg) prior to a 0.9% NaCl i.p. injection on day 15. Groups 6 and 7 received the aqueous extract of *Melissa officinalis* (100 mg/kg) (10 mL/kg b.w. per day by gavage) for 2 weeks prior to a 0.9% NaCl or MMS i.p. injection on day 15. The mice were killed by cervical dislocation, 24 h after treatment, for the evaluation of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in the bone marrow. The Comet assay was performed on all groups and samples of peripheral blood were collected from mouse tail tips by means of a small incision 4 h after treatment with MMS.

2.5 Micronucleus test

The micronucleus assay was performed according to the US Environmental

Protection Agency Gene-Tox Program (25). Bone marrow from both femurs was suspended in foetal calf serum and smears on clean glass slides were prepared.

Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a blind analysis. One thousand polychromatic erythrocytes were analyzed per mouse. To detect possible cytotoxic effects, the proportion of PCE and NCE (normochromatic erythrocytes) in 200 erythrocytes/animal was calculated. The slides were scored blindly using a light microscope with a 100x immersion objective.

2.6 Comet Assay

Single Cell Gel Electrophoresis or Comet assay is a highly sensitive method for the assessment of DNA damage formation and repair both at clinically relevant and low doses. The alkaline Comet assay was performed as described by Singh et al. (26). Peripheral blood samples were collected by the tail from each animal in heparinized microtubes, 4 h after the MMS treatment. For assessment of the repair process, the cells were submitted to Comet assay 4 h after last administration of the chemical agent. Briefly, 5 μ L of whole blood was embedded in a layer consisting of 95 μ L of 0.75% low melting point agarose gel on frosted slides and immersed in a lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM EDTA, and 10 mM Tris [pH 10.0–10.5] with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide) for a minimum of 1 h and a maximum of 1 week. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min. The nuclei were electrophoresed for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA, and then the alkali was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5). After neutralization, the slides were fixed (15% w/v trichloroacetic acid, 5% w/v zinc

sulfate, 5% glycerol), washed in distilled water and dried overnight. The gels were re-hydrated for 5 min in distilled water, and then stained for 15 min (37°C) with a solution containing the following sequence: 34 mL of Solution B (0.2% w/v ammonium nitrate, 0.2% w/v silver nitrate, 0.5% w/v tungstosilicic acid, 0.15% v/v formaldehyde, 5% w/v sodium carbonate) and 66 mL of Solution A (5% sodium carbonate). The staining was stopped with 1% acetic acid and then the gels were air-dried (27). The extent of the DNA damage was assessed using the Collins' visual classification method (28). Cells were scored from 0 (undamaged) to 4 (maximally damaged) according to tail intensity (size and shape), resulting in a single DNA damage score (damage index) for each sample and, consequently, for each group. Thus, a damage index (DI) of the group could range from 0 (completely undamaged) 100 cells \times 0 to 400 (maximum damage) 100 cells (\times 4). The percentage damage frequency (DF) was calculated for each sample on the basis of the number of cells with a tail versus with no tail.

2.7 Statistical analysis

The normality of variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. For the micronucleus test and Comet assay, we performed multiple pair-wise comparisons between the experimental groups and the positive and negative controls using Student's *t*-test at a significance level of 0.05. The statistical package used was BioEstat 5.0. The percentage of reduction in the frequency of MMS induced DNA damage was calculated according to Waters et al. (29) and Azevedo et al. (30) (Fig. 2).

3. RESULTS

Table 1 shows the phytochemical analyses of *M. officinalis* extract. The analyses indicated the presence of fenolic compounds, tannins, flavonoids, alkaloids and coumarins. Yet, other secondary metabolites such as anthraquinones and saponins were not detected.

The Comet assay results are summarized in Table 2. Results from the analyses of DNA damage in both parameters of the Comet assay (damage index and damage frequency) in the peripheral blood of mice indicated that the ingestion of water, ethanolic extract of *M. officinalis* 500 mg/kg (EMO), and aqueous extract of *M. officinalis* (AMO) by the animals during the 15 days of treatment did not present any statistically significant difference. The analyses have demonstrated low values of damage index (DI) and damage frequency (DF), showing that these beverages do not have a genotoxic effect on peripheral blood cells of mice. When the antigenotoxicity of EMO at the two doses and the AMO were evaluated, significant decreases in MMS-induced DNA damage were observed in mice receiving 250 mg/kg and 500 mg/kg of EMO at DI and DF. The reduction in DNA damage with the pre-treatment with 250 mg/kg of EMO was of 19.3% ($P < 0.05$, Student's *t*-test) for DF and 34.8% ($P < 0.01$, Student's *t*-test) for DI in relation to the positive control (MMS 40 mg/kg). Concerning the 500 mg/kg of EMO, the reduction values were better, as 53.4% ($P < 0.001$, Student's *t*-test) and 46.2% ($P < 0.05$, Student's *t*-test) for DF and DI, respectively. However, the analyses of DNA damage after pre-treatment with de AMO indicated that this kind of extract did not diminish the DNA damage chemically induced by MMS.

Results from the MN test in bone marrow cells of mice are presented in Table 3. Also in this assay the values of water, EMO at 500 mg/kg, and AMO have demonstrated low values of micronucleated cells, showing that the compounds did not have a mutagenic nor a cytotoxic effect on mouse bone marrow cells, i.e., no statistically significant difference in the frequency of MN PCE or the ratio of PCE to NCE among the negative control and the groups that have ingested the beverages could be detected. When the antimutagenicity of EMO and AMO were evaluated, a significant decrease in the frequency of MMS-induced MNPCE was observed just in mice that received 500 mg/kg of EMO, with $P = 0.05$ (Student's *t*-test), although with the 250-mg/kg EMO dose the P value ($P = 0.09$) showed a tendency to be significant. Similarly, results for AMO did not show statistically significant reductions in the frequency of MN PCE.

4. DISCUSSION

In recent years, a number of studies have reported that diet is a highly important factor in terms of cancer induction or prevention. It is already known that some dietary micronutrients, like flavonoids, carotenoids, and others can play an important role in the modulation or prevention of cancer development (31). The ingestion of plant extracts with medicinal properties represents an alternative for the treatment of different pathological states in economically unprivileged countries. However, in the absence of a scientific basis, such practices may generate serious adverse effects (7). The evaluation of the role of plant extracts, infusions and the main phytochemical compounds concerning this antigenotoxic/antimutagenic activity is of great importance, since antimutagenic

substances present in some plants have been shown to help prevent cancer and other diseases (6,32-34). Thus, studies on genotoxicity and antigenotoxicity can help evaluate the safety and effectiveness of many plants used in folk medicine. The analyses of the genotoxic and antigenotoxic activity of plant extracts may therefore make possible to design less expensive therapies to be used in developing regions, especially for prevention treatments. In this study, we have tested the effect of two different extracts of *M. officinalis* against a well-known genotoxic compound to investigate new potential antigenotoxic agent from the natural sources for the possible use in the diseases prevention.

M. officinalis has been shown to contain compounds with antioxidant, antinociceptive and antitumoral properties (1,7,14,15); however, so far no study has demonstrated the antigenotoxic activity of this plant. So, in this work we investigated not only its toxicogenetic potential, but also a possible antimutagenic and antigenotoxic effect of *M. officinalis in vivo* against DNA damage induced by MMS, an alkylating agent. There are reasons to believe that phenolic compounds present in *M. officinalis* and in many other plants of the Lamiacea family might be responsible for the protective barrier against DNA damage caused by highly reactive free radicals (1,14,35).

Our first and very important observation was the absence of DNA strand breaks in the Comet assay and the formation of micronuclei induced in mice that have received the two kinds of extract of *M. officinalis*. In our work, neither the ethanolic nor the aqueous extract presented genotoxic or mutagenic properties in the Comet assay and in the MN test, respectively. Pereira et al. (16) is the only work that has evaluated the genotoxic activity of a compound present in *M.*

officinalis, rosmarinic acid. The authors showed that the brain and the peripheral blood samples from rats treated with rosmarinic acid and sacrificed 3 h later showed no significant difference in any of the parameters used to assess DNA damage by the Comet assay in comparison with the vehicle-treated control group.

When the protective effect of *M. officinalis* was investigated in peripheral blood cells by the Comet assay and in the bone marrow PCE by the MN test, the results clearly indicated that *M. officinalis* ethanolic extract was more efficient in reverting antigenotoxic damage (as shown in the Comet assay) than the antimutagenic damage (MN test) induced by MMS. However, the aqueous extract obtained from the infusion of *M. officinalis* in hot water (like a tea) did not exert any protective activity against the DNA damage induced by MMS both in the Comet assay and MN test.

Antioxidant activity of *M. officinalis* extracts have been described (1,13,14), and this activity has been attributed mainly to the phenolic compounds present in this plant. These compounds form one of the largest and most ubiquitous groups of plant metabolites, and their antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and anticarcinogenic activities have currently become the object of much interest (35-37). Pereira et al. (1) have used encephalic tissue in the TBARS assay and determined the quantity of phenolic compounds in the plant extracts to verify a possible relationship with antioxidant activity. The authors found that the aqueous extract of *M. officinalis* had the highest activity against TBARS production induced by all tested agents, when compared with ethanolic and methanolic extracts. Interestingly, the inhibition of lipid peroxidation by *M. officinalis* extracts increases with its phenol content. However, in the DPPH assay, the three different extracts

obtained from this plant (aqueous, ethanolic and methanolic) presented similar effect. In addition, Mimica-Dukic et al. (13) showed that the examined oil of *M. officinalis* exhibited high radical scavenging capacity and a very strong protective activity in lipid peroxidation processes, which was found to correlate positively to the content of mainly monoterpene ketones and aldehydes. These results agree with data reported by other authors, which demonstrate that the antioxidant activity of some Lamiaceae species, fruits, and vegetables correlated positively with the content of phenolic compounds (38- 40).

It is generally accepted that phenolic compounds behave as antioxidants, as a result of the reactivity of the phenolic moiety. Several antioxidant activity mechanisms have been elucidated, but it is believed that radical scavenging via hydrogen atom donation is the predominant mode. Other established antioxidant mechanisms involve radical complexing of pro-oxidant metals as well as quenching through electron donation and singlet oxygen quenching (14).

In our study, the ethanolic extract of *M. officinalis* presented antigenotoxic/antimutagenic activities. As the phenolic compounds have shown all these antioxidant properties, we believe that these same compounds are responsible for the antigenotoxic/antimutagenic activity of *M. officinalis* ethanolic extract.

Phenolic compounds can protect biological systems in different ways (41,42). Phenolic compounds have a dual effect on phase I and phase II enzymes, repressing some enzymes (mainly in phase I) and stimulating others (mainly in phase II) (43). Some flavonoids, like hesperetin, can selectively inhibit human Cytochrome P450, reducing the absorption/elimination of toxic compounds (44).

Other phenolic compounds, such as limonoids, are inducers of the detoxifying enzyme glutathione S-transferase. The stimulation of detoxifying enzymes can facilitate the elimination of toxic compounds, significantly affecting the toxic potential of endogenous and exogenous chemicals (42). However, because MMS is a directly acting alkylant that does not require metabolic activation, the antimutagenic activity of *M. officinalis* is not due to an interaction with activating enzymes (45). Franke et al. (35), with the aim of evaluating if orange juice could reduce DNA damage induced by MMS in mice, showed that under their experimental conditions orange juice reduced the extent of DNA damage caused by this alkylant. For MMS, the antigenotoxic effect of the orange juice was both protective and reparative, in the pre-treatment the post-treatment, respectively. The authors showed that the components of orange juice can have several biological effects, including the role of targets to toxicants and modulating metabolism/detoxification routes. Moreover, phenolic compounds such as myricetin can stimulate DNA repair pathways, through transcription regulation or mRNA stabilization (46).

It is likely that phenolic compounds can be methylated by alkylating agents, instead of the conjugation enzymes, protecting/reducing DNA from alkylation. MMS can methylate nucleophilic regions of DNA and amino acid molecules, particularly at nitrogen atoms. Methylation of phosphate groups accounts for a minor percentage of the total methylation by MMS (<1%). MMS genotoxicity is mediated by base modifications, which weaken the N-glycosylic bond, leading to depurination/depyrimidination of DNA strands and the appearance of alkali-labile abasic sites (AP sites). The removal of AP sites by AP endonucleases cleaves

DNA adjacent to these sites and generates DNA strand breaks in DNA (35,47,48). To a minor extent, MMS can also act as a weak oxidative stress inducer, as observed by Horvathova et al. (47), who tested the effect of a synthetic antioxidant (Stobadine, SBT) on MMS genotoxicity.

To elucidate the mechanism of antigenotoxic/antimutagenic action of *M. officinalis* we performed two assays. An antimutagenic effect in the MN test could mainly be due to reduced induction of damage or increased repair; however, the Comet assay measures the amount of DNA damage after treatment with a mutagen and thus can indicate if an antigenotoxic effect is due to reduced formation of primary DNA lesions. We were able to show a clear induction of DNA effects by MMS and could demonstrate that this effect can be reduced by pre-treatment of the animals with ethanolic extract. Pre-treatment with *M. officinalis* ethanolic extract as a 250-mg/kg dose could reduce MMS genotoxicity by about 19.3 and 34.8% for DF and DI, respectively, while the *M. officinalis* ethanolic extract at the highest dose was capable to reduce 53.4 and 46.2% for both parameters of the Comet assay (DF and DI, respectively). In the MN test, the significant reduction was only observed at the highest dose of the ethanolic extract. Thus, *M. officinalis* extract prevented MMS-induced DNA lesions. In the pre-treatment, phenolic compounds could have competed as target sites for alkylation. On the other hand, the absence of a protective effect from the aqueous extract obtained from *M. officinalis* against the frequency of DNA lesions and mutations induced by MMS could be due to possible interactions among compounds contained within the extract itself.

Taken together, our results suggest that ethanolic extract of *M. officinalis*

have antigenotoxic/antimutagenic properties and that the pre-treatment diminishes the induction of DNA damage by an alkylant agent. Potential differences in the antigenotoxic/antimutagenic activity from different extracts still need to be established. These findings emphasize the fact that *M. officinalis* could serve not only as flavoring agent but also as safety antigenotoxic supplement in preventing genetic damage induced by chemical agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LITERATURE CITED

1. Pereira, R.P.; Fachineto, R.; Prestes, A.S.; Puntel R.L.; Boschetti, T.K.; Athayde, M.L.; Büerguer, M.E.; Morel, A.F.; Morsch, V.M.; Rocha, J.B.T. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem. Res.* **2009**, 34, 973-983.
2. Tovart, R.T. Clinical approach to clinical herbal toxicity. *Semin. Diagn. Pathol.* **2009**, 26, 28-37.
3. Bresolin, S.; Vargas, V.M.F. Mutagenic potencies of medicinal plants screened in the Ames test. *Phytother. Res.* **1993**, 7, 260-262.
4. Sá-Ferreira, I.C.F.; Vargas, V.M.F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. *Phytother. Res.* **1999**, 13, 397-400.
5. Fernandes, J.B.F.; Vargas, V.M.F. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. *Phytother. Res.* **2003**, 17, 269-273.
6. Berhow, M.; Wagner, E.; Vaughn, S.; Plewa, M. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutat. Res.* **2000**, 448, 11-22.
7. Souza, A.C.; Alviano, D.S.; Alves, P.B.; Alviano, C.S.; Gattass C.R. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, 56, 677-681.
8. Hernández-Ceruelos, A.; Madrigal-Bujaidadar, E.; De La Cruz, C. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicol.*

- Lett.* **2002**, 135, 103-110.
9. Carnat, A.P.; Carnat, A.; Fraisse, D.; Lamaison, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm. Acta Helv.* **1998**, 72, 301-305.
 10. Herodez, S.S.; Hadolin, M.; Skerget, M.; Zeljko, K. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.* **2003**, 80, 275- 282.
 11. Salah, S.M.; Jäger, A.K. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol.* **2005**, 97, 145-149.
 12. Dastmalchi, K.; Dorman, H.J.D.; Oinonen, P.P.; Darwis, Y.; Laakso, I.; Hiltunen, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT – Food Sci. Technol.* **2008**, 41,391-400.
 13. Mimica-Dukic, N.; Bozin, B.; Socovik, M.; Simin, N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2485-2489.
 14. Canadanovic-Brunet, J.; Cetkovic, G.; Djilas, S.; Tumbas, V.; Bogdanovic, G.; Mandic, A.; Markov, S.; Cvetkovic, D.; Canadanovic, V. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J. Med. Food* **2008**,11,133-143.
 15. Guginski, G.; Luiz, A. P.; Silva, M.S.; Massaro, M.; Martins, D.F.; Chaves, J.; Mattos, R.W.; Silveira, D.; Ferreira, V.M.M.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.S. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice.

- Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, 93, 10-16.
16. Pereira, P.; Tysca, D.; Oliveira, P.; Da Silva-Brum, L.F.; Picada, J.N.; Ardenghi, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol. Res.* **2005**, 52, 199-203.
 17. Czechtot, H.; Kusztelak, J. A study of the genotoxic potential of flavonoids using short-term bacterial assays. *Acta Biochim. Pol.* **1993**, 40, 549-554.
 18. Gomes-Carneiro, M.R.; Dias, D.M.M.; De Oliveira A.C.A.X.; Paumgarten, F.J.R. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* **2005**, 585, 105-112.
 19. *Farmacopéia Brasileira*, four edition.; Atheneu, São Paulo, Brazil, **2005**, Vol. 2. Fasc. 6.
 20. Müzell, D.P. *Propriedades biológicas de extratos de Melissa officinalis L. (Lamiaceae) em ratos wistar*. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
 21. Harborn, J.B. Phenolic compounds. In: *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*, third edition.; Harborne J.B., Ed.; Chapman & Hall, London, United Kingdom, **1998**, pp. 40-106.
 22. Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, second edition.; Springer, Berlin, Germany, **2009**, pp. 380.
 23. Vrzoc, M.; Petras, M.L. Comparison of alkaline single cell gel comet and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat. Res.* **1997**, 381, 31- 40.
 24. Azevedo, L.; Lima, P.L.A, Gomes, J.C.; Stringheta, P.C.; Ribeiro, D.A.;

- Salvadori, D.M.F. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, 45, 852- 858.
25. Mavournin, K.H.; Blakey, D.H.; Cimino, M.C.; Salamone, M.F.; Heddle, J.A. The *in vivo* Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **1990**, 232, 29-80.
26. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **1988**, 175, 184-191.
27. Villela, I.V.; Oliveira, I.M.de.; Silva, J.da.; Henriques, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.* 2006, 605, 78- 86.
28. Collins, A.; Dusinska, M.; Franklin, M.; Somorosyska, M.; Petroyska, H.; Duthie, S.; Fillion, L.; Panyotidis, M.; Raslová, K.; Vaughan, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* **1997**, 30, 139-146.
29. Waters, M.D.; Brady, A.L.; Stack, H.F.; Brockman, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* **1990**, 238, 57- 85.
30. Azevedo, L.; Gomes, J.C.; Stringheta P.C.; Gontijo, A.M.M.C.; Padovani, C.R.; Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41, 1671-1676.
31. World Cancer Research Fund Food, nutrition and the prevention of cancer: A

- global perspective. Washington: American Institute for Cancer Research; **1997**, 508-40, pp. 35-71.
32. Nishino, H. Cancer prevention by carotenoids. *Mutat. Res.* **1998**, 402, 159-163.
33. Surh, Y.; Ferguson, L.R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. *Mutat. Res.* **2003**, 485, 1-8.
34. Patel, D.; Shukla, S.; Gupta, S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int. J. Oncol.* **2007**, 30, 233-245.
35. Franke, S.I.R.; Pra, D.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P.; Silva, J.da. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. *Mutagenesis* **2005**, 20,279-283.
36. Atoui, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* **2005**, 89, 27- 36.
37. Geetha, T.; Malhotra, V.; Chopra, K.; Kaur, I.P. Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of Quercetin. *Indian. J. Exp. Biol.* **2005**, 43, 61-67.
38. Ivanova, D.; Gerova, D.; Chervenkov, T.; Yankova, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* **2005**, 96,145- 150.
39. Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; Jukic, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **2006**, 94, 550-557.
40. Pérez-Pérez, E.M.; Rodríguez-Malaver, A.J.; Padilla, N.; Medina-Ramírez, G.; Dávila, J. Antioxidant capacity of crude extracts from clones of banana and

- plane species. *J. Med. Food* **2006**, 9, 517- 523.
41. Edenharder, R.; Sager, J.W.; Glatt, H.; Muckel, E.; Platt, K.L. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluoreno and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-6] pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutat. Res.* **2002**, 521, 57- 72.
 42. Kelly, C.; Jewell, C.; O'Brien, N.M. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. *Nutr. Res.* **2003**, 23, 681- 690.
 43. Szaefer, H.; Cichocki, M.; Brauze, D.; Baer-Dubowska, W. Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr. Cancer* **2004**, 48, 70- 77.
 44. Doostdar, H.; Burke, D.; Mayer, R.T. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **2000**, 144, 31- 38.
 45. Lima, P.L.A.; Delmanto, R.D.; Sugui, M.M.; Eira, A.F.; Salvadori, D.M.F.; Speit, G.; Ribeiro, L.R. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. *Mutat. Res.* **2001**, 496, 23- 32.
 46. Abalea, V.; Cillard, J.; Dubos, M.P.; Sergent, O.; Cillard, P.; Morel, I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 1457- 1466.
 47. Horvathova, E.; Slamenova, D.; Hlincikova, L.; Mandal, T.K.; Gabelova, A.; Collins, A.R. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined

with the comet assay. *Mutat. Res.* **1998**, 409, 163- 171.

48. Boiteux, S.; Guillet, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **2004**, 3, 1- 12.

Figure captions

Fig. 1. Experimental design to test the antimutagenicity and antigenotoxicity of *Melissa officinalis* extract on the mutagen-induced micronuclei and Comet assay effects.

Fig. 2. Formula to calculate the percentage of damage reduction. A = positive control treated group with MMS; B = group treated with different concentrations of both extract of *Melissa officinalis* + MMS; C= negative control group.

Table 1. Phytochemical screening

Test	<i>Melissa officinalis</i>
Phenolic compounds	
<i>W-Ext</i> + KOH 3%	+
<i>W-Ext</i> + FeCl ₃ 1%	+
Tannins	
<i>W-Ext</i> + gelatine	-
<i>W-Ext</i> + FeCl ₃ 3%	+
Flavonoids (qualitative)	
<i>W-Ext</i> + MgO/HCl	+
Flavonoids (quantitative) at UV 425 nm	
<i>CH₃OH-Ext</i>	0.572
Alkaloids	
<i>W-Ext</i> + Mayer's Reagent	-
<i>W-Ext</i> + Bertrand's Reagent	-
<i>W-Ext</i> + Dragendorff's Reagent	-
<i>W-Ext</i> + Bouchard's Reagent	+
Antraquinones	
<i>W-Ext</i> + KOH 3%	-
Coumarins	
<i>CH₃CH₂OH-Ext</i> + KOH/UV 365 nm	+
Saponins	
<i>W-Ext</i> + HCl (persistent foam)	-

W-Ext – water extract./ *CH₃OH-Ext* – methanolic extract / *CH₃CH₂OH-Ext* – ethanolic extract / (-)negative / (+)

Table 2. Effects of the different doses of pre-treatments with *Melissa officinalis* extracts (gavage) on primary DNA

Treatments	Comet Assay				
	Number of animals	DF	% reduction	DI	% reduction
Negative Control	5	10.2 ± 2.6	–	10.2 ± 2.6	–
Positive Control	5	83.8 ± 9.4	–	134.4 ± 29.0	–
EMO 250mg/kg + MMS	5	69.6 ± 6.8 ^a	19.3	91.2 ± 13.8 ^b	34.8
EMO 500 mg/kg + MMS	5	44.5 ± 15.4 ^c	53.4	77.0 ± 36.1 ^a	46.2
EMO 500 mg/kg + saline	5	10.0 ± 2.5	–	13.8 ± 2.7	–
AMO 100 mg/kg + saline	5	12.4 ± 2.7	–	14.8 ± 3.4	–
AMO 100 mg/kg + MMS	5	68.4 ± 20.5	–	172.0 ± 101.3	–

lesion (mean ± SD) in peripheral blood of mice exposed to MMS 40 mg/kg.

SD = Standard Deviation; DF = Damage Frequency; DI = Damage Index; Negative Control = NaCl 0.9%; Positive Control = MMS 40mg/kg; EMO = Ethanolic extract of *Melissa officinalis*; AMO = Aqueous extract of *Melissa officinalis*; ^aValues significant in relation to the positive control, P <0.05; ^bP <0.01; ^cP <0.001 (Student's t-test).

Table 3. Effects of the different doses of pre-treatments with *Melissa officinalis* extracts (gavage) on the frequencies of MNPCEs (mean \pm SD) in bone marrow of mice after intraperitoneal injection with MMS 40 mg/kg.

Treatments	Micronucleus Test			
	Number of analyzed cells	Proportion EPC/ENC x 1000	MNPCEs	P Values
Negative Control	1000	230.6 \pm 4.5	3.8 \pm 1.1	–
Positive Control	1000	231.8 \pm 7.7	5.2 \pm 1.8	–
EMO 250mg/kg + MMS	1000	233.8 \pm 9.4	3.6 \pm 1.6	0.09
EMO 500 mg/kg + MMS	1000	239.0 \pm 3.5	2.5 \pm 2.5	0.05 ^a
EMO 500 mg/kg + saline	1000	236.8 \pm 7.9	3.2 \pm 2.3	–
AMO 100 mg/kg + saline	1000	227.0 \pm 5.4	3.2 \pm 1.8	–
AMO 100 mg/kg + MMS	1000	226.4 \pm 5.1	6.4 \pm 1.7	0.15

MNPCE= Micronucleates polychromatic erythrocytes; SD = Standard Deviation; EMO = Ethanolic extract of *Melissa officinalis*; AMO = Aqueous extract of *Melissa officinalis*; Negative Control = NaCl 0.9%; Positive Control = MMS 40mg/kg. ^aValues significant in relation to the positive control, Student *t*-test.

Figure 1.

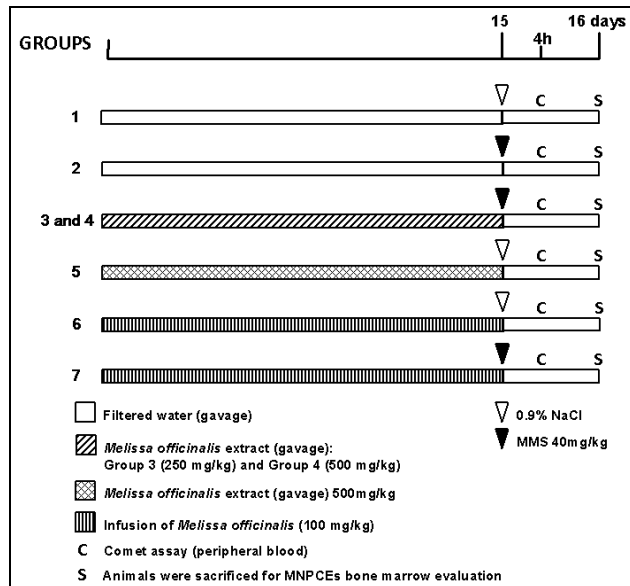


Figure 2.

$$\% \text{ reduction} = \frac{\begin{array}{l} \text{(mean of frequency damage A)} \\ - \text{(mean of frequency damage B)} \\ \text{(mean of frequency damage A)} \\ - \text{(mean of frequency damage C)} \end{array}}{\text{(mean of frequency damage A)}} \times 100$$

PARTE III

4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, vários estudos têm relatado que a dieta é um fator muito importante em termos de indução de câncer ou de prevenção. Já se sabe que alguns micronutrientes na dieta, como flavonóides, carotenóides e outros, pode desempenhar um papel importante na modulação ou na prevenção do desenvolvimento do câncer (WCRF/AICR, 1997). A ingestão de extratos de plantas com propriedades medicinais representa uma alternativa para o tratamento de diferentes estados patológicos em países economicamente desprivilegiados. No entanto, na ausência de uma base científica, tais práticas podem gerar efeitos adversos graves (Sousa et al., 2004). Dessa forma avaliar o papel de extratos de plantas, infusões e dos principais compostos fitoquímicos em relação a atividade antígenotóxica / antimutagênica é de grande importância, uma vez que substâncias antimutagênicas estão presentes em algumas plantas e tem mostrado ajudar na prevenção do câncer e outras doenças (Nishino, 1998 ; Berhow et al. 2000, Surh & Ferguson, 2003, Patel et al., 2007). Assim, os estudos de genotoxicidade e antígenotoxicidade podem ajudar a avaliar a segurança e eficácia de muitas plantas utilizadas na medicina popular. As análises da atividade genotóxica e antígenotóxica de extratos de plantas pode, portanto, tornar possível o projeto de terapias menos dispendiosas, para ser usado em regiões em desenvolvimento, especialmente para os tratamentos de prevenção. Neste estudo, nós testamos o efeito de dois diferentes extratos de *M. officinalis* contra um composto genotóxico conhecido, para investigar o potencial de novos agentes antígenotóxicos provenientes de fontes naturais para a possível utilização na prevenção de doenças.

Melissa officinalis tem demonstrado conter compostos com propriedades antioxidante, antinociceptiva e antitumoral (Sousa et al., 2004; Canadanovic-Brunet et al., 2008, Pereira et al., 2009; Guginski et al., 2009), no entanto, até o momento, nenhuma atividade antígenotóxica foi investigada nesta planta.

Assim, neste trabalho estamos interessados em investigar não só o seu potencial tóxicogenético, mas também um possível efeito antimutagênico e antigenotóxico de *M. officinalis* in vivo contra danos no DNA induzidos por um agente alquilante, o MMS. Há razões para acreditar que os compostos fenólicos presentes na *M. officinalis* e em muitas outras plantas da família Lamiacea, poderiam ser um dos agentes responsáveis pela barreira protetora contra danos no DNA causados por radicais livres altamente reativos (Franke et al., 2005; Canadanovic-Brunet et al., 2008, Pereira et al., 2009).

Nossa primeira e muito importante observação, foi a ausência de quebras no DNA, detectado pelo Ensaio Cometa e pela formação de micronúcleos induzidos em camundongos, que receberam por gavagem os dois tipos de extrato de *M. officinalis*. Em nosso trabalho, tanto o extrato etanólico como o aquoso não apresentaram propriedades genotóxicas e mutagênicas, avaliados pelo Ensaio cometa e pelo Teste Micronúcleo, respectivamente. O trabalho de Pereira et al. (2005) é o único que avaliou a atividade genotóxica de um composto presente na *M. officinalis*, o ácido rosmarínico. Eles mostraram que as amostras de cérebro e sangue periférico de ratos tratados com ácido rosmarínico e sacrificados 3 h depois, não mostraram nenhuma diferença significativa em qualquer um dos parâmetros utilizados, avaliando os danos do DNA pelo ensaio cometa, em comparação ao grupo controle.

Quando o efeito protetor do *M. officinalis* foi investigado em células do sangue periférico pelo ensaio cometa e pelo teste de MN em medula óssea, os resultados indicaram claramente que o extrato etanólico de *M. officinalis* exibiu atividade antigenotóxica contra danos no DNA induzidos pelo agente mutagênico MMS *in vivo*, e, que de uma maneira mais fraca este mesmo extrato também apresenta uma atividade antimutagênica. No entanto, o extrato aquoso obtido da infusão de *M. officinalis* em água quente (como um chá) não exerce qualquer atividade protetora contra os danos no DNA induzidos pelo MMS, tanto no ensaio cometa como no teste MN.

Atividades antioxidantes dos extratos de *M. officinalis* foram descritas (Mimica-Dukic et al., 2004; Canadanovic-Brunet et al., 2008, Pereira et al., 2009) e

a maioria delas atribuiu esta atividade aos compostos fenólicos presentes nesta planta. Estes compostos são um dos maiores e mais ubíquos dos grupos de metabólitos das plantas, e há interesse atual em sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica (Atoui et al., 2005; Franke et al., 2005; Gheeta et al., 2005). Pereira et al. (2009) usaram tecido encefálico para o ensaio TBARS e determinar a quantidade de compostos fenólicos nos extratos de plantas para verificar uma possível relação com a atividade antioxidante. Eles descobriram que o extrato aquoso de *M. officinalis* apresentou a maior atividade contra a produção de TBARS induzida por todos os agentes testados, quando comparados com os extratos etanólico e metanólico. Curiosamente, a inibição da peroxidação lipídica por extratos de *M. officinalis* mostrou uma relação com o seu conteúdo fenólico. No entanto, no ensaio DPPH, os três diferentes extratos obtidos a partir desta planta (aquoso, etanólico e metanólico) apresentaram efeitos semelhantes. Além disso, Mimica-Dukic et al. (2004) mostrou que o óleo de *M. officinalis* examinado apresenta alta capacidade de retirada dos radicais livres e uma atividade muito forte de proteção nos processos de peroxidação lipídica, e que foi encontrado uma correlação com o conteúdo de cetonas e aldeídos, principalmente monoterpenos. Estes resultados estão de acordo com dados relatados por outros autores, que a atividade antioxidante de algumas espécies de plantas da família Lamiaceae, frutas e legumes está correlacionada com o teor de compostos fenólicos presentes nas mesmas (Ivanova et al., 2005; Katalinic et al. 2006; Perez-Perez et al., 2006).

É geralmente aceito que os compostos fenólicos comportam-se como antioxidantes como resultado da reatividade da fração fenólica. Existem vários mecanismos para a atividade antioxidante, mas acredita-se que a atividade seqüestradora de radicais livres via doação de átomos de hidrogênio é o modo predominante. Outros mecanismos antioxidantes estabelecido envolvem a complexação de radicais de metais pró-oxidantes, bem como de arrefecimento através da doação de elétrons e extinção do oxigênio singlet (Canadanovic-Brunet et al., 2008). Em nosso estudo, *M. officinalis* apresentaram atividades antígeno-tóxicas / antimutagênicas quando o extrato de etanol foi feito. Como os

compostos fenólicos têm mostrado todas estas propriedades antioxidantes, acreditamos que estes mesmos compostos são os responsáveis pela atividade antigenotóxica / antimutagênica do extrato etanólico de *M. officinalis*.

Os compostos fenólicos podem proteger os sistemas biológicos de diferentes maneiras (Edenharder et al., 2002, Kelly et al., 2003). Os compostos fenólicos têm um duplo efeito sobre as enzimas de fase I e fase II, reprimindo algumas enzimas (principalmente na fase I) e estimulando outras (principalmente na fase II) (Szaefer et al., 2004). Alguns flavonóides, como a hesperetina, podem seletivamente inibir o citocromo P450 humano, reduzindo a absorção/eliminação de compostos tóxicos (Doostdar et al. 2000). Outros compostos fenólicos, tais como limonóides são indutores da enzima de detoxificação glutaciona S-transferase. A estimulação de enzimas detoxificantes pode facilitar a eliminação de compostos tóxicos, afetando significativamente o potencial tóxico de substâncias endógenas e exógenas (Kelly et al., 2003). No entanto, pelo fato de o MMS ser um alquilante de ação direta, que não requer ativação metabólica, provavelmente a atividade antimutagênica de *M. officinalis* não é devido a uma interação com as enzimas de ativação (Lima et al., 2001). Franke et al. (2005) com o objetivo de avaliar se o suco de laranja pode reduzir danos ao DNA, induzidos pelo MMS em camundongos, mostrou que em suas condições experimentais, o suco de laranja reduziu a extensão do dano no DNA. Para o MMS, o efeito antigenotóxico do suco de laranja era tanto de proteção, com suco de laranja no pré-tratamento como reparadora, com suco de laranja no pós-tratamento. Eles mostraram que os componentes do suco de laranja, podem ter vários efeitos biológicos, incluindo a ação como alvos de tóxicos e modulando rotas de metabolização/detoxificação. Além disso, compostos fenólicos, tais como miricetina pode estimular vias de reparo do DNA, através da regulação da transcrição ou estabilização do RNAm (Abalea et al., 1999). É provável que compostos fenólicos possam ser metilados por agentes alquilantes, ao invés das enzimas de conjugação, protegendo/reduzindo a alquilação do DNA. O MMS pode metilar regiões nucleofílicas da molécula de DNA e de aminoácidos, particularmente em átomos de nitrogênio. A metilação dos grupos fosfatos conta para o menor percentual total de metilação pelo MMS (<1%). A genotoxicidade

causada pelo MMS é mediada por modificações de base, as quais enfraquecem a ligação N-glicosídica, levando a depuração/depurinação/depirimidinação das fitas do DNA, e o aparecimento de sítios álcali-lábeis abásicos. A remoção de sítios AP pelas enzimas AP endonucleases cliva o DNA adjacentes a estes locais, e gera quebras no DNA. (Horvathova et al., 1998; Boiteux & Guillet, 2004; Franke et al., 2005). Em menor medida o MMS também pode atuar como um indutor fraco de estresse oxidativo, como observado por Horvathova e colaboradores (1998), que testaram o efeito de um antioxidante sintético (Stobadine, SBT) sobre a genotoxicidade do MMS.

Para elucidar o mecanismo de ação antígenotóxica / antimutagênica de *M. officinalis* realizamos dois ensaios. O efeito antimutagênico apresentado no teste de MN pode principalmente ser devido à indução reduzida de danos ou aumento de reparo; porém, o Ensaio Cometa mede a quantidade de dano no DNA após o tratamento com um mutagênico, e dessa forma assim pode indicar um efeito antígenotóxico devido a reduzida formação de lesões primárias no DNA. Nós fomos capazes de mostrar uma clara indução de efeitos no DNA pelo MMS e pudemos demonstrar que esse efeito pode ser reduzido pelo pré-tratamento dos animais com o extrato etanólico de *M. officinalis*. O pré-tratamento com o extrato etanólico de *M. officinalis* na dose de 250mg/kg pode reduzir a genotoxicidade induzida pelo MMS em aproximadamente 19,3 e 34,8% para a frequência de dano (FD) e o índice de dano (ID), respectivamente, enquanto que o extrato etanólico da *M. officinalis* na dose mais elevada foi capaz de reduzir a 53,4 e 46,2% para ambos os parâmetros do ensaio cometa (FD e ID, respectivamente). E no teste de MN a redução significativa foi observada somente na dose mais elevada do extrato etanólico. Assim, o extrato de *M. officinalis* foi preventivo para lesões do DNA induzidas pelo MMS. No pré-tratamento, os compostos fenólicos podem ter competido como local de destino para alquilação. Por outro lado, a ausência de um efeito protetor do extrato aquoso obtido de *M. officinalis* contra a frequência de lesões no DNA e mutações induzidas pelo MMS, pode ser devido a possíveis interações entre os compostos contidos no próprio extrato.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o extrato etanólico de

M. officinalis tem propriedades antígenotóxicas/antimutagênicas, e que o pré-tratamento diminui a indução de danos no DNA causados por agente alquilante. Possíveis diferenças na atividade antígenotóxicas/antimutagênicas de diferentes extratos ainda precisam ser estabelecidos. Estes resultados enfatizam que a *M. officinalis* poderia servir não apenas como agente saborizante, mas também como um suplemento antígenotóxico seguro na prevenção de danos genéticos induzidos por agentes químicos. Além disso, espera-se que consumo de alimentos produzidos com extratos de plantas aromáticas (alimentos funcionais) possa evitar o risco de doenças dependentes de radicais livres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALEA V; CILLARD J; DUBOS MP; SERGENT O; CILLARD P; MOREL I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. **Free Radical Biology and Medicine** 26: 1457- 1466. 1999.
- ABREVAYA XC; MUDRY MD; CARBALLO, MA. Mouse bone marrow micronucleus test to evaluate strain sensitivity in front of potencial genotoxic agents. **Basic and Applied Genetics** XVI: 60. 2004.
- AKLHONDZADEH S; NOROOZIAN M; MOHAMMADI M; OHADINIA S; AMSHIDI AH; KHANI M. *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry** 74: 863-866. 2003.
- ALBERTINI RJ; ANDERSON D; DOUGLAS GR; HAGMAR L; HEMMINKI K; MERLO F; NATARAJAN AT; NORPPA H; SHUKER DEG; TICE R; WATERS MD; AITIO A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research** 463: 111-172. 2000.
- ALLAHVERDIYEV A; DURAN N; OZGUVEN M; KOLTAS S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against *Herpes simplex* virus type -2. **Phytomedicine**, 11: 657-661. 2004.
- ALONSO J. **Fitomedicina: Curso para profissionais da área de saúde**. Pharmabooks, 1ª Edição, São Paulo, 2008. 195 págs.
- ANDRADE HHR; ANDRADE HR; REGULY ML. Prevenção do câncer: o papel da dieta e da quimioprevenção. In: **Genética Toxicológica**. (Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, eds.) Alcançe, Porto Alegre, pp. 369-387. 2003.
- ANTUNES LMG; ARAÚJO MCP. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição** 13: n.2, 81-88. 2000.
- ATOUI AK; MANSOURI A; BOSKOU G; KEFALAS P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry** 89: 27- 36. 2005.
- BERHOW M; WAGNER E; VAUGHN S; PLEWA M. Characterization and

- antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research** 448: 11-22. 2000.
- BOITEUX S; GUILLET M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair** 3: 1- 12. 2004.
- BOLKENT S; YANARDAG R; KARABULUT-BULAN O; YESILYAPRAK B. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on the liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology** 99: 391- 398. 2005.
- BRESOLIN S; VARGAS VMF. Mutagenic potencies of medicinal plants screened in the Ames test. **Phytotherapy Research** 7: 260-262. 1993.
- BURLINSON B; TICE RR; SPEIT G; AGURELL E; BRENDLER-SCHAAB, SY; COLLINS AR; ESCOBAR P; HONMA M; KUMARAVEL TS; NAKAJIMA M; SASAKI YF; THYBAUD V; UNO Y VASQUEZ M; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup. **Mutation Research** 627:31-35. 2007.
- CANADANOVIC-BRUNET J; CETKOVIC G; DJILAS S; TUMBAS V; BOGDANOVIC G; MANDIC A; MARKOV S; CVETKOVIC D; CANADANOVIC V. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. **Journal of Medicinal Food** 11:133- 143. 2008.
- CARNAT AP; CARNAT A; FRAISSE D; LAMAISON JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. **Pharmaceutica Acta Helvetiae** 72: 301-305. 1998.
- COLLINS A; DUSINSKA M; FRANKLIN M; SOMOROSYSKA ; PETROYSKA H; DUTHIE S; FILLION L; PANYIOTIDIS M; RASLOVÁ K; VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 30: 139-146. 1997.
- COTELLE S; FÉRARD JF. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 34: 246-255.1999.
- CZECZOT H; KUSZTELAK J. A study of the genotoxic potential of flavonoids using short-term bacterial assays. **Acta Biochimica Polonica** 40: 549-554. 1993.
- DASTMALCHI K; DORMAN HJD; OINONEN PP; DARWIS Y; LAAKSO I;

- HILTUNEN R. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. **LWT – Food Science and Technology**. In press, 2007.
- DE FLORA S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research** 402: 151-158. 1998.
- DE FLORA S; RAMEL C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. **Mutation Research** 202: n. 2, 285-306. 1988.
- DOOSTDAR H; BURKE D; MAYER RT. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. **Toxicology** 144: 31- 38. 2000.
- EDENHARDER R; SAGER JW; GLATT H; MUCKEL E; PLATT KL. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluoreno and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-6] pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. **Mutation Research** 521: 57- 72. 2002.
- ERDTMANN B. A genotoxicidade nossa de todos os dias; In: **Genética Toxicológica** (Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, eds.) Alcance, Porto Alegre, pp. 23-46. 2003.
- FAIRBAIRN DW; OLIVE PL; O' NEILL KL. The comet assay:a comprehensive review. **Mutation Research** 339: 37-59. 1995.
- FERGUNSON LR. Mechanisms approaches to chemoprevention of mutation and cancer. **Mutation Research** 591: 3-7. 2005.
- FERNANDES JBF; VARGAS VMF. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. **Phytotherapy Research** 17: 269-273. 2003.
- FERREIRA A; PROENÇA C; SERRALHEIRO MLM; ARAÚJO MEM. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology** 108: 31-37. 2006.
- FRANKE SIR; PRÁ D; ERDTMANN B; HENRIQUES JAP; SILVA J da. Influence of

- orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. **Mutagenesis** 20: 279-283. 2005.
- GARCIA O; MANDINA T; LAMADRID AI; DIAZ A; REMIGIO A; GONZALEZ Y; PILOTO J; GONZALEZ JE; ALVAREZ A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research** 556: 25-34. 2004.
- GAZOLA R; MACHADO D; RUGGIERO C; SINGI G; ALEXANDRE MM. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research** 50: 477-480. 2004.
- GEETHA T; MALHOTRA V; CHOPRA K; KAUR IP. Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of Quercetin. **Indian Journal of Experimental Biology** 43: 61- 67. 2005.
- GOMES-CARNEIRO MR; DIAS DMM; DE OLIVEIRA ACAX; PAUMGARTTEN FJR. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutation Research** 585: 105-112. 2005.
- GUGINSKI G; LUIZ AP; SILVA MS; MASSARO M; MARTINS DF; CHAVES J; MATTOS RW; SILVEIRA D; FERREIRA VMM; CALIXTO JB; SANTOS ARS. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 93: 10-16. 2009.
- HARTMANN A; SPEIT G. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair DNA. **Repair Protocols** 113: 203-212. 1999.
- HAYASHI M; TICE RR; MACGREGOR JT; ANDERSON D; BLAKEY DH; KIRSCH-VOLDERS M; OLESON FBJR; PACCHIEROTTI F; ROMAGNA F; SHIMADA H; SUTOU S; VANNIER B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research** 312: 293-204. 1994.
- HEDDLE J.A; CIMINO MC; HAYASHI M; ROMAGNA F; SHELBY MD; TUCKER JD; VANPARYS PH; MACGREGOR JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular**

- Mutagenesis** 18: 277-291, 1991.
- HEITZ A; CARNAT A; FRAISSE D; CARNAT AP; LAMAISON J.L. Leotelin 3'-glucoronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. **Fitoterapia** 71: 201-202. 2000.
- HERNÁNDEZ-CERUELOS A; MADRIGAL-BUJADADAR E; DE LA CRUZ C. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. **Toxicology Letters** 135: 103-110. 2002.
- HORN RC; VARGAS VMF. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutagenesis** 18: 113-118. 2003.
- HORVATHOVA E; SLAMENOVA D; HLINCIKOVA L; MANDAL TK; GABELOVA A; COLLINS AR. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. **Mutation Research** 409: 163- 171. 1998.
- IVANOVA D; GEROVA D; CHERVENKOV T; YANKOVA T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96:145- 150. 2005.
- JUCHIMIUK J; GNYS A; MALUSZYNSKA J. DNA damage induced by mutagens in plant and human cell nuclei in a cellular comet assay. **Folia Histochemica et Cytobiologica** 44: 127-131. 2006.
- KADA T; MORITAK; INOUE T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutation Research** 53: n.3, 351-353. 1978.
- KATALINIC V; MILOS M; KULISIC T; JUKIC M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry** 94: 550-557. 2006.
- KELLY C; JEWELL C; O'BRIEN NM. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. **Nutrition Research** 23: 681- 690. 2003.
- KENNEDY DO; WAKE G; SAVELEVS; TILDESLEY NTJ; PERRY EK; WESNES KA; SCHOLEY AB. Modulation of mood and cognitive performance following

- acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarínico receptor-binding properties. **Neuropsychopharmacology** 28: 1871-1881. 2003.
- LIMA PLA; DELMANTO RD; SUGUI MM; EIRA AF; SALVATORI DMF; SPEIT G; RIBEIRO LR. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mutation Research** 496: 23- 32. 2001.
- LORENZI H; MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MACGREGOR JT; HEDDLE JA; HITE M; MARGOLIN BH; RAMEL C; SALAMONE MF; TICE RR; WILD D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research** 189: 103-112. 1987.
- MAVOURNIN KH; BLAKEY DH; CIMINO MC; SALAMONE MF; HEDDLE JA. The *in vivo* Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. GeneTox Program. **Mutation Research** 232: 29-80. 1990.
- MIMICA-DUKIC N; BOZIN B; SOKOVIC M; SIMIN N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52: 2485-2489. 2004.
- MÜLLER SF; KLEMENT S. A combination of valeriana and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dyssomnia in children. **Phytomedicine** 13: 383- 387. 2006.
- MÜZELL DP. **Propriedades biológicas de extratos de melissa officinalis I. (lamiaceae) em ratos wistar**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- NADIN SB; VARGAS-ROIG ML; CIOCCA DR. A silver staining for single-cell gel assay. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society** 49: 1183-1186. 2001.
- NISHINO H. Cancer prevention by carotenoids. **Mutation Research** 402: 159-163.

- 1998.
- PATEL D; SHUKLA S; GUPTA S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). **International Journal of Oncology** 30: 233-245. 2007.
- PEREIRA P; TYSCA D; OLIVEIRA P; DA SILVA BRUM LF; PICADA JN; ARDENGHI P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacology Research** 52: 199-203. 2005.
- PEREIRA RP; FACHINETTO R; PRESTES AS; PUNTEL RL; BOSCHETTI TK; ATHAYDE ML; BÜRGER ME; MOREL AF; MORSCH VM; ROCHA JBT. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Nerouchemical Research**. 34: 973-983. 2009.
- PÉREZ-PÉREZ EM; RODRÍGEZ-MALAVAR AJ; PADILLA N; MEDINA-RAMÍREZ G; DÁVILA J. Antioxidant capacity of crude extracts from clones of banana and plantain species. **Journal of Medicinal Food** 9: 517- 523. 2006.
- PETERSEN M; SIMMONDS MSJ. Rosmarinic acid. **Phytochemistry** 62:121-25. 2003.
- PICADA JN; FLORES DG; ZETTLER CG; MARRONI NP; ROESLER R; HENRIQUES JAP. Dna damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. **Molecular Brain Research** 114: 80-85. 2003.
- REZENDE JR; RODRIGUES SB; JABOR IAS; PAMPHILE JA; ROCHA CLMSC. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum** 26: n. 4, 481-484. 2004.
- RIBEIRO LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: **Mutagênese Ambiental** (Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, eds). Canoas, RS: Editora da Ulbra, pp173-200. 2003.
- RIBEIRO MA; BERNARDO-GIL MG; ESQUÍVEL MM. *Melissa officinalis*, L. study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercritical Fluids** 21: 51-60. 2001.
- RICE-EVAN CA; PACKER L. **Flavonóides in Health and disease**. 2 ed. London: Marcel Dekker. 2003. 467p.

- RODRIGUES SB; JABOR IAS; SILVA GGM; ROCHA CLMSC. Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema methG1 em *Aspergillus (=Emericella) nidullans*. **Acta Scientiarum** 25: n. 2, 513-517. 2003.
- SÁ-FERREIRA ICF; VARGAS VMF. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytotherapy Research** 13: 397-400. 1999.
- SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. Reparação de DNA em células eucarióticas; In: **Genética Toxicológica** (Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P.; eds.) Alcance, Porto Alegre, pp. 271-304. 2003.
- SALAH SM; JÄGER AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. **Journal of Ethnopharmacology** 97: 145-149. 2005.
- SALAMONE MF; MAVOURNIN KH. Bone marrow micronucleos assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleos frequencies. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 23: 239-273. 1994
- SANDRAEI H; GHANNADI A; MALEKSHAHI K. Relaxant effect of essencial oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia** 74: 445-452. 2003.
- SANTOS-NETO LL; TOLEDO MAV; MEDEIROS-SOUZA P; SOUZA GA. The use of Herbal medicine in Alzheimer's disease – A sistematic review. **Advance Access Publication** 23: 441-445. 2006.
- SCHEMANN M; MICHEL K; ZELLER F; HOHENESTER B; RÜHL A. Regionspecific effects of STW 5 (Iberogast®) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. **Phytomedicine** 13: 90-99. 2006.
- SIMMEN U; KELBER O; OKPANYI SN; JAEGGI R; BUETER B; WEISER D. Binding of STW 5 (Iberogast®) and its components to intestinal 5-HT muscarínico M3, and opioid receptors. **Phytomedicine** 13: 51-55. 2006.
- SEKIHASHI K; YAMAMOTO A; MATSUMURA Y; UENO S; WATANABE-AKANUMA M; KASSIE F; KNASMULLER S; TSUDA S; SASAKI Y.F. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. **Mutation Research** 517: 53-75. 2002.
- SILVA J DA; DE FREITAS TRO; HEUSER V; MARINHO JR; BITTENCOURT F;

- CERSKI CTS; KLIEMANN LM; ERDTMANN B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research** 470: 39-51. 2000.
- SIMÕES CMO; MENTZ LA; SCHENKEL EP; IRGANG BE; STEHMANN JR. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5^o ed. Porto Alegre, RS: UFRGS, 1998. 172p.
- SINGLH NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. **Mutation Research** 455: 111-127. 2000.
- SOUZA AC; ALVIANO DS; BLANK AF; ALVES PB; ALVIANO CS; GATTASS C.R. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 56: 677-681. 2004.
- SPENCER JPE; MANAL M; MOHSEN AE; RICE-EVANS C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 423:148-61. 2004.
- SURH Y; FERGUSON LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. **Mutation Research** 485: 1-8. 2003.
- SZAEFER H; CICHOCKI M; BRAUZE D; BAER-DUBOWSKA W. Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. **Nutrition and Cancer** 48: 70- 77. 2004.
- TICE RR; AGURELL E; ANDERSON D; BURLINSON B; HARTMANN A; KOBAYASHI H; MIYAMAE Y; ROJAS E; RYU JC; SASKI YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis** 35: 306-221. 2000.
- VALVERDE M; FORTOUL TI; DIAZ-BARRIGA F; MEIJA J; DEL CASTILLO ER. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. **Mutagenesis** 17: 55-61. 2002.
- VON BORSTEL RC; DRAKE JW; LOEB LA. Foreword. **Mutation Research** 350: n.1, 1-3.1996.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER

RESEARCH (WCRF/AICR). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. **American Institute for Cancer Research**, Washington, 1997.

YEN GC; CHEN HY. Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas. **Mutagenesis** 11: 37-41. 1996.

ZIAKOVÁ A; BRADSTETEROVÁ E; BLAHOVÁ E. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. **Journal of Chromatography A** 983: 271-275. 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)