

## Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L.

GONTIJO, D.C.<sup>1</sup>; FIETTO, L.C.<sup>1</sup>; LEITE, J.P.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, CEP: 36570-000, Brasil. Endereço correspondência. Tel. +55 31 38993044, E-mail: jpvleite@ufv.br

**RESUMO:** A espécie *Ocimum gratissimum* L., popularmente conhecida como alfavaca, é uma planta muito usada na medicina tradicional brasileira, à qual são atribuídas diversas atividades terapêuticas quando usada na forma de infuso de suas folhas. Neste estudo foi realizada a caracterização fitoquímica, a avaliação da ação antioxidante e a investigação dos efeitos antimutagênico e antigenotóxico, além do efeito mutagênico e genotóxico potencial do extrato aquoso liofilizado a partir das folhas de *O. gratissimum* (EAOG). O conteúdo de polifenóis totais no extrato foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu, sendo encontrado 11,3 µg EAG/mg de EAOG. A atividade antioxidante foi avaliada pelo teste do 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), apresentando IC<sub>50</sub> de 83,0 µg/mL. A antimutagenicidade e mutagenicidade foram avaliadas em cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) utilizando o teste *Salmonella*/microsoma (*Salmonella typhimurium*/microsomas) em diferentes concentrações. EAOG induziu a atividade antimutagênica para a cepa TA98. A mutagenicidade não foi observada para o extrato em ambas as linhagens. Adicionalmente, a ação antigenotóxica avaliada pelo teste de clivagem do DNA-plasmidial também foi observada para EAOG. Os resultados também demonstraram que o extrato não foi capaz de induzir a genotoxicidade pelo teste empregado. Este estudo relata, pela primeira vez, as propriedades antimutagênica e antigenotóxica do extrato aquoso de *O. gratissimum*.

**Palavras-chave:** *Ocimum gratissimum*, atividade antioxidante, antimutagenicidade, antigenotoxicidade, avaliação toxicológica.

**ABSTRACT: Phytochemical Assessment And Antioxidant, Antimutagenic And Toxicological Activity Of *Ocimum gratissimum* L. Leaf aqueous extract.** The species *Ocimum gratissimum* L., popularly known as Clove Basil, is a plant widely used in traditional Brazilian medicine, and several therapeutic activities are attributed to it when used as infusion of its leaves. In this study, we carried out a phytochemical characterization and the assessment evaluation and investigation of the antioxidant action of the antimutagenic and antigenotoxic effects and the potential mutagenic and genotoxic effects of the freeze-dried aqueous extract of the *O. gratissimum* (EAOG) leaves. The total polyphenol content in the extract was determined by the Folin-Ciocalteu method, and we found 11.3 µg EAG/mg of EAOG. The antioxidant activity was assessed by the 1,1-diphenyl-2-picryl hidrazil (DPPH), with IC<sub>50</sub> of 83.0 µg/mL. Antimutagenicity and mutagenicity were assessed in *Salmonella typhimurium* (TA98 and TA100) strains using the *Salmonella*/microsome (*Salmonella typhimurium*/microsome) test in different concentrations. EAOG induced antimutagenic activity for strain TA98. Mutagenicity was not observed for the extract in both strains. Additionally, antigenotoxic action, assessed by cleavage of the DNA-damage, was also observed for EAOG. The results also show that the extract was not able to induce genotoxicity by the test used. This study reports for the first time the antimutagenic and antigenotoxic properties of the *O. gratissimum* aqueous extract.

**Keywords:** *Ocimum gratissimum*, antioxidant activity, antimutagenicity, antigenotoxicity, toxicological assessment.

## INTRODUÇÃO

O interesse por compostos antioxidantes é cada vez maior atualmente uma vez que o estresse oxidativo pode causar danos à nível molecular, como, por exemplo, danos ao DNA, desempenhando papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Marín-Martinez e colaboradores, 2009). O dano oxidativo está diretamente relacionado com muitas doenças crônicas incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e vários tipos de câncer (Huang e colaboradores, 2005). Dessa forma, na tentativa de amenizar a ação de radicais livres, diversos compostos com potencial antioxidante estão sendo investigados visando redução de efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Ben Sghaiera e colaboradores, 2011).

Devido à nocividade de alguns antioxidantes sintéticos largamente usados, tais como o butilhidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), os quais são tóxicos e carcinogênicos, a busca por antioxidantes naturais tem elevado o número de pesquisas envolvendo produtos de origem vegetal como fontes potenciais de antioxidantes (Oyetayo, 2009). Antioxidantes naturais, tais como metabólitos secundários fenólicos e terpenóides (Verioglou, 1998) podem apresentar potencial atividade de reduzir a ação de agentes químicos ou físicos capazes de induzir danos ao material genético agindo assim como antimutagênicos e/ou antígenotóxicos. Contudo, sabe-se também que alguns metabólitos oriundos de plantas podem interagir com o material genético, causando alterações no DNA (Ames, 1983).

À espécie *Ocimum gratissimum* L., pertencente à família botânica Lamiaceae, são atribuídas diversas ações terapêuticas, tais como: efeito hipoglicêmico, antihelmintíco e antifúngico (Aguiyi e colaboradores, 2000; Pessoa e colaboradores, 2002). Popularmente conhecida como “alfavaca”, “alfavaca-cravo” ou “manjeriço-cheiroso”, possui uso popular como diurética, larvicida, analgésico, antiséptica, dentre outros (Lorenzi & Matos, 2002). Estudos fitoquímicos assinalam a presença de terpenos e esteróides, quinonas, flavonóides, saponinas e taninos nas folhas e raízes desta espécie (Dumblenton, 1990; Robineau, 1991).

Estudos apontam o óleo essencial de *O. gratissimum* rico em eugenol, timol e citral (Dubey e colaboradores, 2000). Estes compostos isolados do óleo essencial mostraram potente ação antioxidante (Pereira & Maia, 2007). Contudo, apesar de existir na literatura relatos sobre a ação antimicrobiana e antioxidante do seu óleo essencial, esta espécie ainda carece de maior investigação quanto ao uso terapêutico de extratos aquosos de suas folhas,

largamente utilizados na medicina popular.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a composição química e o potencial das ações: antioxidante e antimutagênica/antigenotóxica do liofilizado do extrato aquoso das folhas de *O. gratissimum*, além de analisar a possível ação mutagênica e genotóxica desta espécie.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes

Todos os solventes orgânicos foram adquiridos da Vetec, bem como os reagentes: sulfato de magnésio heptahidratado, ácido cítrico, fosfato de sódio e amônio, fosfato de potássio dibásico, cloreto de sódio, L-histidina, azida sódica, glicose e cloreto de estanho. Os reagentes DPPH<sup>•</sup> e BHT foram adquiridos da Sigma Chemical Co; o reagente de Folin-Ciocalteu foi obtido da Dinâmica; o padrão de ácido gálico foi obtido da Labsynth; a fase estacionária sílica-gel F254 foi obtida da Merk; Bacto, Agar, e agarose foram obtidos da Himedia; D-biotina foi obtida da Inlab; 4-nitro-*o*-fenilenodiamino foi obtido da Aldrich; e brometo de etídio foi obtido da Sigma.

### Obtenção do Material vegetal

O material vegetal de *O. gratissimum* foi coletado no horto de plantas medicinais do Grupo “Entre Folhas” na Universidade Federal de Viçosa, em setembro de 2008. Exsicata do material coletado foi depositada no Herbário VIC, da mesma universidade (VIC 11.594). Folhas de *O. gratissimum* foram mantidas em sala ventilada e escura, sob temperatura ambiente até sua secagem, sendo, posteriormente, pulverizadas em moinho tipo faca e armazenadas ao abrigo da luz em frascos de vidro vedados.

### Obtenção do extrato vegetal

O extrato vegetal foi preparado por infusão na proporção de 1:40 (p/v). As folhas pulverizadas de *O. gratissimum* foram deixadas em contato com água destilada fervente durante 15 minutos, sob agitação. Após este procedimento, o material foi filtrado à vácuo em papel filtro. Em seguida, o extrato obtido foi congelado a -80°C e levado à concentração no liofilizador, obtendo-se o extrato seco. O rendimento da extração de *O. gratissimum* (EAOG) foi de 20,94%.

### Prospecção fitoquímica

Nos testes de prospecção fitoquímica foram avaliadas as presenças das seguintes classes de metabólitos secundários: cumarinas, flavonoides,

antraquinonas, taninos, alcaloides, triterpenos/esteroides e saponinas. Para este procedimento utilizou-se cromatografia em camada delgada de sílica gel utilizando reveladores específicos para cada classe de metabolitos, segundo metodologias descritas por Wagner e colaboradores (1984).

#### *Determinação do teor de polifenóis totais*

A determinação de polifenóis foi realizada usando reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com Verza e colaboradores (2007) com adaptações. Assim, a 250 µg de EAOG diluídos em 8,5 mL de água destilada, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após três minutos à adição do reagente, adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio a 15% p/v. A solução foi então homogeneizada e deixada em repouso por 60 minutos, sendo determinada a absorbância em 760 nm, em espectrofotômetro contra padrão branco. Todos os testes foram realizados em triplicata. Ácido gálico foi usado como padrão para a curva de calibração, sendo os teores de polifenóis totais expressos como µg de equivalentes de ácido gálico por mg de extrato (µg EAG / mg EAOG).

#### *Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH•*

A atividade sequestrante (antioxidante) do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) do extrato foi determinada de acordo com Blois (1958) e Wu e colaboradores (2011). Diferentes quantidades (10, 50, 100, 150 e 200 µg) de EOAG foram diluídas em 1 mL de metanol. Para o padrão BHT as diferentes quantidades utilizadas foram 3, 15, 45, 85 e 125 µg também diluídas em 1 mL de metanol. De cada uma destas soluções, foi retirada uma alíquota de 0,3 mL, à qual foram adicionados 2,7 mL da solução de DPPH• (0,7 mM) preparada no momento do uso. A absorbância a 517 nm foi mensurada após 30 minutos de reação na ausência de luz. Cada determinação foi realizada em triplicata. O controle negativo (sem adição de amostra ao DPPH) foi utilizado para cálculo da percentagem da atividade antioxidante. Pela análise da curva de calibração por regressão linear, foi calculada a quantidade em massa de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• (IC<sub>50</sub>). A percentagem de DPPH• remanescente foi calculada a partir da equação:

$$\% \text{ de captura do radical DPPH} \cdot = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100\%$$

Onde: Ac = Absorbância do controle; Aa = Absorbância da amostra

#### *Ensaio antimutagênico e mutagênico*

Os ensaios de antimutagenicidade e mutagenicidade foram realizados utilizando o

método de pré-incubação de 20-30 minutos (Maron & Ames, 1983) com linhagens de *Salmonella typhimurium*/microsoma TA98 e TA100 sem ativação metabólica S9. EAOG foi testado nas doses de 62,5, 125, 250, 375, 500 µg/placa diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO). As doses testadas foram estimadas com base na ausência de toxicidade à bactéria em testes preliminares. Para o teste antimutagênico, a cada concentração da mistura testada, foram adicionados 500 µL de tampão fosfato pH 7,4, 100 µL de cultura de bactéria (D.O.<sub>600nm</sub> 0,4) e agentes mutagênicos, sendo, posteriormente, incubados a 37°C por 30 min. Já para o ensaio de mutagenicidade as diferentes concentrações de EAOG foram misturadas a 500 µL de tampão fosfato pH 7,4 e 0,1 mL de cultura de bactérias (D.O.<sub>600nm</sub> 0,4), sendo, posteriormente, incubadas por 30 minutos a 37°C. As demais etapas do teste seguiram o mesmo protocolo para os ensaios antimutagênicos e mutagênicos. Decorrido os 30 minutos de incubação, 2 mL de “ágar de superfície” contendo traços de histidina e biotina foram adicionados aos tubos e misturados, sendo a seguir “plaqueado” em placa contendo meio mínimo glicosado. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e as colônias revertentes *his+* foram contadas. O experimento foi realizado em triplicata. DMSO (solvente) foi utilizado como controle negativo. Agentes mutagênicos (4-nitro-O-fenilenodiamino para linhagem TA98 e azida sódica para a cepa TA100) foram usados como controles positivos.

Para o teste antimutagênico foi calculada a percentagem de inibição mutagênica, determinada segundo Oh e colaboradores (2008), como:

$$\% \text{ Inibição mutagênica: (Controle(+)- Dose testada)X100/Controle(+)- Controle(-)}$$

A ação antimutagênica foi classificada de acordo com Caillet et al. (2011) sendo considerada forte a ação antimutagênica maior que 70%; moderada, entre 40% e 70%, e neutra, abaixo de 40%. Já para o ensaio mutagênico foi calculada a razão de mutagenicidade (R.M.) para cada dose analisada, a qual é a média do número de revertentes na placa teste, dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (reversões espontâneas). As amostras foram consideradas com resultado positivo quando a razão de mutagenicidade foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas.

#### *Ensaio antígeno tóxico e genotóxico*

Para a avaliação do potencial antígeno tóxico e genotóxico de EAOG foi empregado o teste de clivagem plasmidial, de acordo com o método de De Mattos e colaboradores (2000). Para o ensaio de antígeno toxicidade, EAOG nas doses de 62,5, 125 e 250 µg foi incubado com 100 µg de DNA plasmidial

pUC18 e 500 µg do agente genotóxico cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>) por 2,5 horas a 37°C. Já no teste de genotoxicidade, as doses de 62,5, 125 e 250 µg de EAOG foram incubadas com 100 µg de DNA plasmidial pUC18 na ausência do agente genotóxico SnCl<sub>2</sub>. As demais etapas foram idênticas para os dois testes. Assim, após as 2,5 horas de incubação, o volume de cada amostra foi completado para 100 µL com Tris-EDTA (TE) e o DNA foi precipitado utilizando etanol 100% e acetato de sódio 3 M pH 5,3. Posteriormente, o DNA plasmidial precipitado foi ressuscitado em 15 µL de água mili-Q, sendo esta alíquota de DNA aplicada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio para visualização. Como controle positivo, utilizou-se 500 µg de cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>) e, como controle negativo, o DNA tratado com água destilada. O teste foi repetido 3 vezes. A densidade do DNA no gel de eletroforese foi quantificada pelo software ImageJ 1.3B (Stankevics e colaboradores, 2008). O DNA plasmidial é avaliado pela presença da forma tensionada superhelicoidal (forma I), conformação helicoidal (forma II) e da conformação circular relaxada (forma III). A comparação entre as bandas de DNA teste com as bandas do DNA dos controles positivo e negativo foi usada para diagnosticar possível ação antigenotóxica e genotóxica do extrato. A ação antigenotóxica, avalia a persistência da topologia plasmidial, mediada por possíveis agentes antigenotóxicos quando tratados juntamente com causadores de genotoxicidade, tal como o cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>), enquanto a avaliação genotóxica utiliza-se da mudança topológica do DNA em contato com os agentes genotóxicos (Dantas e colaboradores, 1999).

#### *Análise Estatística*

A avaliação estatística do teste antimutagênico, as médias de inibição mutagênica do controle positivo e das doses testadas, foram comparadas pelo teste t ( $P < 0,05$ ), seguido de análise de regressão linear.

Para os testes mutagênicos os resultados foram avaliados por análise de médias (Teste de Student – teste T) entre as médias da razão de mutagenicidade do controle negativo e as médias da razão de mutagenicidade nas diferentes doses testadas, seguido de regressão linear.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### *Prospecção fitoquímica*

A análise fitoquímica de EAOG indicou a presença de saponinas, flavonoides e taninos. Outros metabólicos secundários como triterpenos/esteroides, cumarinas, antraquinonas e alcaloides

não foram detectados. A escolha da água como solvente esta diretamente relacionada aos resultados observados para os grupos de metabólitos secundários obtidos, uma vez que a alta polaridade do solvente favorece a extração de compostos fenólicos e/ou heterosídeos como flavonóides, taninos e saponinas, conforme observado. Em estudos também com extrato aquoso das folhas de *O. gratissimum*, Offiah & Chikwendu (1999) verificaram a presença de taninos, esteróides, triterpenos e carboidratos. Akinmoladun e colaboradores (2007) observaram, para o extrato aquoso das folhas, a presença de taninos, terpenos e esteroides, flavonoides, saponinas e glicosídeos cardiotônicos. Diferenças metodológicas na obtenção do extrato e/ou na avaliação da prospecção fitoquímica podem ser responsáveis pelas diferenças observadas entre os resultados obtidos neste trabalho e as referências pesquisadas.

#### *Conteúdo fenólico total e ação antioxidante por DPPH*

O teor de polifenóis totais, expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), observado para EAOG foi  $11,3 \pm 0,05$  µg EAG/mg de EAOG. Estudo do extrato metanólico das folhas de *O. gratissimum* apresentou  $5,68 \pm 0,06$  mg/g EAG (Akinmoladun e colaboradores, 2007). A extração de compostos fenólicos de material vegetal com água tem sido evidenciado em vários trabalhos como boa condição para otimizar o teor desses compostos nos extratos de plantas (Saririkku e colaboradores, 2009). Compostos polifenólicos de origem vegetal têm recebido considerável atenção devido às suas funções fisiológicas, incluindo antioxidante, antimutagênica e atividades antitumorais, podendo ter implicações benéficas para a saúde humana (Li e colaboradores, 2006; Kubola & Siriamornpun, 2008).

Para a atividade antioxidante pelo método do DPPH observou-se IC<sub>50</sub> de  $83,00 \pm 1,76$  µg/mL. O padrão sintético BHT, usado como controle positivo, apresentou IC<sub>50</sub> de  $6,34 \pm 2,17$  µg/mL. Sabe-se que quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante da amostra analisada. Devido à complexidade fitoquímica encontrada em um extrato como o caso de EAOG, o valor de IC<sub>50</sub> obtido pode ser visto como potencial ação antioxidante deste extrato. O menor valor de IC<sub>50</sub> para o padrão BHT está diretamente relacionado à pureza do composto, já reconhecidamente um agente antioxidante. Nesse sentido, a potencial atividade antioxidante da espécie *O. gratissimum* já foi demonstrada em estudos pelo método do DPPH, no qual o extrato metanólico das folhas de *O. gratissimum*, mostrou atividade 84,6% a 250 µg/mL (Akinmoladun e colaboradores, 2007).

Em trabalhos realizados com extratos

vegetais tem sido possível observar correlações estatísticas entre o conteúdo de polifenóis totais medido pelo método Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante determinada pelo teste do DPPH-, evidenciando a importância destes metabólitos secundários para a atividade antioxidante (Wong e colaboradores, 2006; Kumararan & Karunakaran, 2007; Abdel-Hameed, 2009). Aos polifenóis são atribuídos ação antioxidante principalmente pela sua forte atividade sequestrante de radical livre e ação quelante (Diouf e colaboradores, 2009).

#### Avaliação antimutagênica e mutagênica

A avaliação antimutagênica de EAOG apresentou valor acima de 50% de inibição de mutagenicidade para a cepa TA98, com diferença significativa para as doses de 375 e 500 µg/placa. Verificou-se também alto valor de regressão dose-resposta (0,90) na percentagem de inibição mutagênica para a cepa TA98. Segundo Caillet e colaboradores (2011), esta percentagem de ação antimutagênica pode ser considerada como ação moderada. Já para a cepa TA100, a ação antimutagênica foi considerada neutra, pois foi menor do que 40% (Caillet e colaboradores, 2011) (Tabela 1). Vários trabalhos relacionam compostos

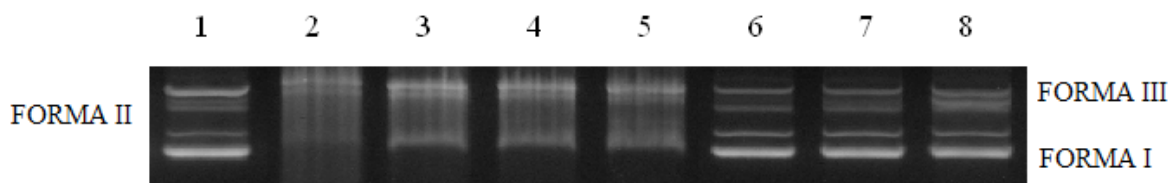
polifenólicos de plantas com propriedades benéficas à saúde humana, incluindo ação antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica e antiinflamatória, as quais têm potencial ação na prevenção de doenças e proteção na estabilidade do genoma (Kuroda & Hara, 1999; Ferguson, 2001; Johnson e colaboradores, 2010). Para a atividade mutagênica de EAOG não se observou efeito mutagênico pela razão de mutagenicidade. Também não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das doses testadas em relação ao controle, além de haver baixo valor de regressão dose-resposta para as duas cepas de *Salmonella typhimurium*/microssoma avaliadas (Tabela 1).

Diferenças de mecanismos de ação para as cepas TA98 e TA100 são importantes para diagnosticar métodos diferentes de interação do extrato dentro da célula, atuando em diversos níveis, tais como replicação, transcrição ou tradução bacteriana. Assim, a cepa TA98, que atua pelo mecanismo de deslocamento de quadro de leitura do DNA, mostrou-se mais suscetível à proteção mutagênica pelo extrato EAOG, diferentemente da menor atividade de EAOG frente a cepa TA100, que avalia substituição de pares de base nitrogenada (Maron & Ames, 1983). Para o teste mutagênico,

**TABELA 1.** Atividade antimutagênica e mutagênica (média do número de colônias revertentes ± desvio padrão) das linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*/microssoma expostas a diferentes doses EAOG.

Dose EAOG (µg/placa)	ANTIMUTAGENICIDADE (% inibição mutagênica)		MUTAGENICIDADE (razão de mutagenicidade)	
	TA98 r <sup>2</sup> = 0,90	TA100 r <sup>2</sup> = 0,01	TA98 r <sup>2</sup> = 0,06	TA100 r <sup>2</sup> = 0,34
0,00 <sup>a</sup>	24,00 ± 4,32	98,00 ± 12,73	18,6 ± 2,49 (1,00)	194,3 ± 20,42 (1,00)
62,5	230,33 ± 24,09 (8,54%)	766,66 ± 104,17 (14,78%)	20,3 ± 3,09 (1,09)	162,6 ± 15,19 (0,84)
125	228,00 ± 31,15 (9,57%)	742,66 ± 33,52 (17,84%)	20,3 ± 2,87 (1,09)	186,3 ± 4,92 (0,96)
250	193,0 ± 19,03 (25,08%)	592,00 ± 69,81 (37,04%)	25,0 ± 1,63 (1,34)	197,6 ± 7,84 (1,02)
375	126,33 ± 20,90 (54,64%)*	745,33 ± 103,00 (17,50%)	22,6 ± 9,03 (1,21)	186,6 ± 29,77 (0,96)
500	131,0 ± 19,30 (52,57%)*	730,66 ± 55,65 (19,37%)	17,3 ± 1,25 (0,93)	190,0 ± 5,71 (0,98)
Controle +	249,60 ± 21,63 <sup>b</sup>	882,66 ± 128,38 <sup>c</sup>	181,0 ± 14,16 <sup>b</sup> (8,13)**	721,3 ± 93,65 <sup>c</sup> (3,72)**

**Nota:** <sup>a</sup>DMSO: 100 µL/placa (controle negativo); Controle + (controle positivo); <sup>b</sup>NPD (4-nitro-O-fenilenodiamino – 2,5 µg/placa); <sup>c</sup>Azida sódica (1,25 µg/placa); r<sup>2</sup>: regressão linear dose-resposta. Ao controle positivo do teste de antimutagenicidade foi atribuído 0% de inibição mutagênica. \*Significância comparada a inibição do controle positivo (P<0,05). \*\*Significância comparada a razão de mutagenicidade do controle negativo (P<0,05).



**FIGURA 1.** Atividades antigenotóxica e genotóxica de EAOG. Nota: 1: controle negativo (100 µg DNA + 10 µL H<sub>2</sub>O); 2: controle positivo (100 µg DNA + 500 µg SnCl<sub>2</sub>); 3: antigenotoxicidade (100 µg DNA + 500 µg SnCl<sub>2</sub> + 62,5 µg de EAOG); 4: antigenotoxicidade (100 µg DNA + 500 µg SnCl<sub>2</sub> + 125 µg de EAOG); 5: antigenotoxicidade (100 µg DNA + 500 µg SnCl<sub>2</sub> + 250 µg de EAOG); 6: genotoxicidade (100 µg DNA + 62,5 µg de EAOG); 7: genotoxicidade (100 µg DNA + 125 µg de EAOG); 8: genotoxicidade (100 µg DNA + 250 µg de EAOG). O teste foi repetido 3 vezes.

não foi significativa a diferença de ação de EAOG frente às cepas estudadas.

#### Avaliação antigenotóxica e genotóxica

O teste antigenotóxico mostrou ação protetora de EAOG contra a degradação do DNA plasmidial causada pelo SnCl<sub>2</sub>, apresentando percentagem de proteção de 40,53%, 34,57% e 51,80% para as doses 62,5, 125 e 250 µg do extrato, respectivamente. Observou-se topologia helicoidal (forma II) das canaletas 3, 4 e 5 das bandas de DNA tratadas com EAOG, diferindo do controle positivo 2, que apresentou apenas a conformação circular relaxada (forma III) (Figura 1).

Para o teste genotóxico não foi observado genotoxicidade de EAOG em nenhuma das doses testadas. Quando comparada com os controles 1 e 2, as canaletas 6, 7 e 8 apresentaram o mesmo padrão topológico das bandas de DNA (formas I, II e III) do controle negativo 1, distinguindo-se do controle positivo 2 (forma III) (Figura 1).

Diferentemente dos mecanismos do teste com *S. typhimurium*/microssoma, a antigenotoxicidade/genotoxicidade avaliada por clivagem plasmidial ocorre por reações de oxirredução com o DNA, ocasionando quebra das fitas do DNA ou diminuição da interação das moléculas deste DNA (Felzenszwalb e colaboradores, 1998; Reiniger e colaboradores, 1999). A ação antigenotóxica de EAOG pode promover a proteção do DNA por diferentes mecanismos: 1) interação de moléculas que compõem EAOG diretamente com o DNA; 2) o seqüestro de íons Sn<sup>2+</sup> que promovem a quebra das fitas do DNA através da redução da ligação fosfodiéster integrantes das fitas de DNA.

Sabe-se que, de maneira geral, compostos fenólicos como os encontrados em EAOG têm grande ação quelante (Mila e colaboradores, 1996).

Nesse sentido, os diferentes tipos de compostos fenólicos (flavonoides e taninos) e o teor de polifenóis totais de EAOG (11,3 µg EAG/mg de EAOG) associados ao seu potencial antioxidante (IC<sub>50</sub> 83,00 µg/mL) são possivelmente responsáveis

pela moderada percentagem de inibição mutagênica observada (acima de 50% para a cepa TA98), além da potencial atividade antigenotóxica de EAOG. Contudo, mais estudos sobre a composição fitoquímica da espécie *Ocimum gratissimum* devem ser realizados a fim de avaliar possíveis marcadores fitoquímicos e substâncias isoladas promotoras das atividades observadas. Além disso, estudos *in vivo* complementares também devem ser feitos para confirmar a ação antioxidante, antimutagênica e antigenotóxica desta espécie.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Prof.<sup>a</sup> Eliana Varanda pela importante contribuição para realização deste trabalho e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

#### REFERÊNCIA

- Abdel-Hameed, E.S.S. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. **Food Chemistry**, 114, 1271-1277, 2009.
- Aguiyi, J.C.; Obi, C.I.; Gang, A.C. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**, 71, 444-446, 2000.
- Akinmoladun, A.C.; Ibukun, E.O.; Afor, E.; Obuotor, E.M.; Farombi, E.O. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Scientific Research and Essay**, 2, 163-166, 2007.
- Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, 221, 1256-1264, 1983.
- Ben Sghaiera, M.; Boubakera, J.; Skandrania, I.; Bouhlela, I.; Limema, I.; Ghediraa, K.; Chekir-Ghedirab, L. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 31, 220-232, 2011.

- Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 181, 1199-1200, 1958.
- Caillet, S.; Lessard, S.; Lamoureux, G.; Lacroix, M. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. **Food Chemistry**, 124, 1699-1707, 2011.
- Dantas, F.J.S.; Moraes, M.O.; Mattos, J.C.P.; Bezerra, R.J.A.C.; Carvalho, M.B.F.; Caldeira-de-Araújo, A. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicology Letters**, 110, 129-136, 1999.
- De Mattos, J.C.P.; Dantas, F.J.S.; Bezerra, R.J.A.C.; Bernardo-Filho, M.; Cabral-Neto, J.B.; Lage, C.; Leitão, A.C.; Caldeira-de-Araújo, A. Damage induced by chloride in plasmid DNA. **Toxicology Letters**, 116, 159-163, 2000.
- Diouf, P.N.; Stevanovic, T.; Cloutier, A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. **Food Chemistry**, 113, 897-902, 2009.
- Dubey, N.K.; Tiwari, T.N.; Mandin, D.; Andriamboavonjy, H.; Chaumont, J.P. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, 71, 567-569, 2000.
- Dumblenton, C. **Medicinal plants in Viet Nam**. England: WHO, Institute of Materia Medica Hanoi, 263 p., 1990.
- Felzenszwalb, I.; De Mattos, J.C.P.; Bernardo-Filho, M.; Caldeira de Araújo, A. Shark cartilage-containing preparation: protection against reactive oxygen species. **Food and Chemical Toxicology**, 36, 1079-1084, 1998.
- Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, 475, 89-111, 2001.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. The chemistry behing antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 1841-1856, 2005.
- Johnson, J.J.; Bailey, H.H.; Mukhtar, H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: A translational perspective. **Phytomedicine**, 17, 3-13, 2010.
- Kubola, J.; Siriamornpun, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. **Food Chemistry**, 110, 881-890, 2008.
- Kumaran, A.; Karunakaran, R.J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **Food Science and Technology (LWT)**, 40, 344-352, 2007.
- Kuroda, Y.; Hara, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Research/ Reviews in Mutation Research**, 436, 69-97, 1999.
- Li, B.B.; Smith, B.; Hossain, M.M. Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. Separation and Purification Technology, 48, 182-188, 2006.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- Marín-Martínez, R.; Veloz-García, R.; Guzmán-Maldonado, S.H.; Loarca-Pina, G.; Cardador-Martínez, A.; Guevara-Olvera, L.; Miranda-López, R.; Torres-Pacheco, I.; Pérez, C.P.; Herrera-Hernández, G.; Villaseñor-Ortega, F.; González-Chavira, M.; Guevara-Gonzalez, R.G. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. **Bioresource Technology**, 100, 434-439, 2009.
- Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, 113, 173-215, 1983.
- Mila, I.; Scalbert, A.; Expert, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. **Phytochemistry**, 42, 1551-1555, 1996.
- Offiah, V.N.; Chikwendu, U.A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 68, 327-330, 1999.
- Oh, H.T.; Kim, S.H.; Choi, H.J.; Chung, M.J.; Ham, S.S. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*). **Toxicology in Vitro**, 22, 1484-1488, 2008.
- Oyetayo, V.O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 380-386, 2009.
- Pessoa, L.M.; Morais, S.M.; Bevilacqua, C.M.L.; Luciano, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil *Ocimum gratissimum* L. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 109, 59-63, 2002.
- Pereira, C.A.M.; Maia, J.F. Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27, 624-632, 2007.
- Reiniger, I.W.; Silva, C.R.; Felzenszwalb, I.; De Mattos, J.C.P.; De Oliveira, J.F.; Dantas, F.J.S.; Bezerra, R.J.A.C.; Caldeira de Araújo, A.; Bernardo-Filho, M. Boldine action against the stannous chloride effect. **Journal of Ethnopharmacology**, 68, 345-348, 1999.
- Robineau L. **Hacia una farmacopea caribeña**. Santo Domingo: Enda-Caribe, 475 p., 1991.
- Sarikurkcu, C.; Arisoy, K.; Tepe, B.; Cakir, A.; Abali, G.; Mete, E. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, 47, 2479-2483, 2009.
- Stankevics, L.; Aiub, C.; De Santa Maria, L.C.; Lobo-Hajdu, G.; Felzenszwalb, I. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. **Toxicology in Vitro**, 22, 1869-1877, 2008.
- Velioglu, Y.S. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 4113-4117, 1998.
- Verza, S.G.; Kreinecker, M.T.; Reis, V.; Henriques, A.T.; Ortega, G.G. Evaluation of analytical variables of the Folin-Ciocalteu method for the quantitation of the total tannins content using a *Psidium guajava* L. leaves aqueous extract as a model. **Química Nova**, 30, 815-820, 2007.
- Wagner, H.; Bland, S.; Zgainski, E.M. **Plant drug analysis**. Springer-Verlag, 320 p., 1984.
- Wong, C.; Li, H.; Cheng, K.; Chen, F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food Chemistry**, 97, 705-711, 2006.
- Wu, C.R.; Lin, W.H.; Hseu, Y.C.; Lien, J.C.; Lin, Y.T.; Kuo, T.P.; Ching, H. Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum* species leaves from Taiwan flora *in vitro*. **Food Chemistry**, 127, 564-571, 2011.