

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE
***Melissa officinalis* L. (LAMIACEAE) EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado
Denise Pereira Müzell

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE
***Melissa officinalis* L. (LAMIACEAE) EM RATOS WISTAR**

Denise Pereira Müzell

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para
obtenção do título de mestre.
Orientadores: Dr. Leandro Vieira Astarita
Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2006

O mestre tem a responsabilidade
de fazer com que o aluno descubra,
não o caminho propriamente dito,
mas as vias de acesso a esse caminho,
que devem conduzir à meta última.

(Eugen Herribel)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
aos meus pais e amigos
Paulo e Maria Helena,
que me incentivaram todos os
momentos e por apoiar em todas
as minhas decisões.

A Deus
por estar sempre
presente em minha
vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares.

Agradeço aos meus padrinhos.

Agradeço aos professores que colaboraram para o meu aperfeiçoamento profissional.

Agradeço aos meus amigos e a todos que de uma forma ou outra contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional e pelo crescimento pessoal.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Vegetal

Agradeço ao orientador e amigo Leandro Vieira Astarita, a professora e amiga Eliane Romanato Santarém e aos amigos e colegas, em especial às biólogas Janaína Belquís Pinto, Siomara Dias da Costa Lemos, Thanise Füller e Adriana de Andrade Figueiró.

Laboratório de Pesquisa em Biofísica

Agradeço ao orientador e amigo Jarbas Rodrigues de Oliveira, as professoras e amigas, Melissa Guerra Pires e Fernanda Bordignon Nunes, aos amigos e colegas, em especial ao Denizar da Silva Melo, Rosélia Rubin, Vasyl C. Saciura, Rodrigo Medeiros Fagundes, Carlos Eduardo Leite, aos biólogos e amigos Eduardo Caberlon, Luís Cláudio D'Avila e Carolina Maria Alves Bastos.

Laboratório de Pesquisa em Botânica

Profa. Eliane Diefenthale Heuser

Laboratório de Farmacognosia

Profª. Clarisse Azevedo Machado e a estagiária Tiane Janoski

Laboratório de Biologia do Envelhecimento (Hospital São Lucas - PUCRS)

Dr. Antônio Carlos Araujo de Souza e as funcionárias Raquel Matos de Oliveira e Priscila Salvato dos Santos.

Laboratório de Anatomia Patológica (Hospital São Lucas - PUCRS)

Dr. Carlos Luiz Reichel e Dr. Antônio Atalíbio Hartmann

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	12
Apresentação do tema	14
1. Introdução	14
2. Plantas medicinais	14
2.1. Família Lamiaceae	15
2.2. Propriedades bioativas de extratos vegetais	15
3. Compostos fenólicos	17
3.1. Absorção dos compostos fenólicos	18
3.2. Biodisponibilidade	18
3.3. Atividade biológica	18
3.3.1. Ação antioxidante	19
3.3.2. Ação antiinflamatória	20
4. Acetaminofen como agente terapêutico e agente tóxico	21
4.1. Bioativação do acetaminofen	22
4.2. Hepatotoxicidade provocada por acetaminofen	23
4.3. Nefrotoxicidade provocada por acetaminofen	25
5. Referências bibliográficas	27
Objetivo Geral e Objetivos Específicos	37
Article I: The effect of extract of <i>Melissa officinalis</i> L. on protection against hepatic and renal lesion induced by acetaminophen (paracetamol)	38
Abstract	39
1. Introduction	40
2. Materials and methods	41
2.1. Plant material	41
2.2. Animals	41
2.3. Quantification of the phenolic compounds and quercetin flavonoids in the extracts	42
2.4. Biochemical analysis of hepatic and renal lesion markers	43
2.5. Histological analysis	43
2.6. Statistical analysis	44
3. Results	44
4. Discussion	45
5. Acknowledgments	46
6. References	47
7. Figures	51

Article II: Anti-inflammatory effect of <i>Melissa Officinalis</i> L. in pleurisy induced by carrageenan in Wistar rats	54
Abstract	55
1. Introduction	56
2. Materials and methods	57
2.1. Plant material	57
2.2. Animals	57
2.3. Quantification of the phenolic compounds and quercetin flavonoids in the extracts	57
2.4. Induction of pleurisy	58
2.5. Exudate analysis	58
2.6. Statistical analysis	58
3. Results	59
4. Discussion	59
5. Acknowledgments	61
6. References	62
7. Figures	66
Considerações finais	68
Conclusão	69
Perspectivas futuras	70

ABREVIATURAS

ALP: fosfatase alcalina

ALT: alanina aminotransferase

APAP: acetaminofen

AST: aspartato aminotransferase

CAT: catalase

CCl₄: tetracloreto de carbono

COX: ciclooxigenase

COX-2: ciclooxigenase-2

CYP: citocromo P450

DT: túbulo distal

Fe⁺³/Fe⁺²: férrico/ferroso

GGT: gama–glutamiltransferase

GPx: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa

H/E: Hematoxilina/Eosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

iNOS: inibidor de óxido nítrico sintetase

Isoformas do CYP: *CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1, CYP3A4, CYP4A2/3, CYP1B1, CYP2B1/2, CYP2E1, CYP2C9, CYP2C11, CYP2C19, CYP2D6*

LDH: lactato desidrogenase

LD₅₀: dose média letal

LPO: peroxidação lipídica

MDA: malondialdeído

MN: células mononucleares

NAC: N-acetilcisteína

NAPQI: *N-acetil-p*-benzoquinona-imina

NO•: óxido nítrico

PAP: *p-aminofenol*

PGE₂: prostaglandina E₂

PMN: células polimorfonucleares

PT: túbulo proximal

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substância ácida reativa tiobarbitúrico

TNF α : fator- α de necrose tumoral

t $\frac{1}{2}$: meia-vida

Resumo

A *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) apresenta altos níveis de compostos fenólicos, como flavonóides e ácido rosmarínico. Estes compostos apresentam uma série de efeitos biológicos, como antiinflamatório, inibido a atividade da ciclooxigenase e a indução/inibição do citocromos P450. O acetaminofen (APAP) é amplamente utilizado como analgésico e antipirético. Porém consumido em altas doses pode provocar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. No presente estudo analisou-se as propriedades bioativas dos extratos de *M. officinalis* na proteção da lesão hepática e renal induzida por acetaminofen, bem como, a ação antiinflamatória na pleurisia induzida por carragenina. Para analisar os efeitos dos extratos aquosos na lesão hepática e na lesão renal foram utilizados ratos machos Wistar. Os animais foram pré-tratados por sete dias, via intragástrica (ig), com extratos aquosos de *M. officinalis* nas dosagens 500 e 250 mg/kg ou solução salina. Após esta fase, os animais foram tratados com solução salina ou 800 mg/kg de APAP via intraperitoneal (ip). Foram também administrados intraperitoneal extrato na dose 200 mg/kg, 30 minutos antes de administrar o APAP ip. Para lesão hepática foram analisados os marcadores bioquímicos aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), enquanto para lesão renal foi analisado o marcador γ -glutamyltransferase (GGT). Ocorreu um aumento nos níveis de AST e ALT no soro em animais pré-tratados com extratos via intragástrica e via intraperitoneal, quando comparado com aqueles pré-tratados com solução salina ig. e tratados com APAP ip. O aumento nos níveis de AST e ALT no soro, e nos níveis GGT na urina dos animais pré-tratados com os extratos aquosos de *M. officinalis* e que receberam APAP, indicou um aumento na hepatotoxicidade e na nefrotoxicidade induzida por APAP. O aumento nos níveis dos marcadores bioquímicos de lesão hepática não foi acompanhado da presença de necrose na região centrolobular nas análises histopatológicas. Para analisar a ação antiinflamatória foram utilizados ratos fêmeas Wistar. Os animais foram pré-tratados com 2 mL/kg de solução salina ou de extratos aquosos de *M. officinalis* nas doses 200, 100 e 50 mg/kg via intraperitoneal, 30 minutos antes de ter sido induzida à pleurisia por carragenina. Os animais pré-tratados com 200 e 100 mg/kg de extrato e tratados com carragenina apresentaram uma ação antiinflamatória, reduzindo os níveis do exsudato, bem como, os níveis de leucócitos e de células polimorfonucleares. Enquanto o extrato na concentração

200 mg/kg induziu a redução de proteínas totais no exsudato pleural, o extrato na concentração 50 mg/kg não apresentou efeito antiinflamatório. Os resultados sugerem que os extratos de *M. officinalis* não protegem o fígado e o rim da toxicidade induzida por APAP. Contudo, apresentam ação antiinflamatória, através de uma dose-resposta dependente, em relação às concentrações dos extratos e dos marcadores inflamatórios.

Palavras-chave: compostos fenólicos, flavonóides, inflamação aguda, efeito hepatoprotetor, efeito nefroprotetor, alanina aminotransferases, aspartato aminotransferase, γ -glutamyltransferase.

ABSTRACT

Melissa officinalis L. (Lemon balm) presents high levels of phenolic compounds such as flavonoids and rosmarinic acid. These compounds display a series of biological effects such as anti-inflammatory, cyclooxygenase activity inhibition and induction/inhibition of P450 cytochromes. Acetaminophen (APAP) is widely used as analgesic and antipyretic. However, when consumed in high doses it could cause hepatotoxicity and nephrotoxicity. This study attempted to analyze the bioactive properties of *M. officinalis* extracts in the protection against hepatic and renal lesion induced by acetaminophen as well as anti-inflammatory actions in pleurisy induced by carrageenan. Male Wistar rats were used for evaluating the effect of aqueous extracts against hepatic and renal lesion. Animals were pre-treated for seven days with intragastric (ig.) aqueous extracts administered at doses of 500 and 250 mg/kg or saline solution. After this phase, animals were treated with saline solution or APAP using intraperitoneal (ip.) administration. Another experiment consisting of 200 mg/kg of extract ip., 30 minutes after 800 mg/kg of APAP administration ip was performed. Hepatic lesion was analyzed using the biochemical markers aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), while renal lesion was evaluated using the marker γ -glutamyltransferase (GGT). There was an increase in the serum levels of AST and ALT in animals pre-treated with extracts way intragastric and intraperitoneal when compared to those pre-treated with saline solution and treated with APAP ip. The increase in the serum levels of AST and ALT and the urine levels of GGT of

the animals pre-treated with *M. officinalis* extracts and that received APAP, indicated the increase of the hepatotoxicity and nephrotoxicity APAP-induced. The increase in the levels of biochemical hepatic lesion markers was not accompanied by the presence of necrosis in the centrilobular region during histopathological analysis. Female Wistar rats were used to analyze the anti-inflammatory action of the extracts. Animals were pre-treated with 2 ml/kg ip. of saline solution or extracts at doses 200, 100 and 50 mg/kg, 30 minutes prior to having pleurisy induced by carrageenan. Animals pre-treated with 200 and 100 mg/kg of extract and carrageenan displayed an anti-inflammatory reaction, reducing the levels of exudate, as well as those of leukocytes and polymorphonuclear cells. While the extract at concentration of 200 mg/kg led to a reduction in the total proteins in the pleural exudate, the extract at concentration 50 mg/kg showed no anti-inflammatory effect. The results suggest that extracts of *M. officinalis* do not protect hepatic and renal against lesion induced by APAP. However, they presented an anti-inflammatory activity, which showed a dose-response effect in relation to the concentrations of extracts and inflammation markers.

Key Words: phenolic compounds, flavonoids, acute inflammation, hepatoprotective effect, nephroprotective, alanine aminotransferases, aspartate aminotransferase, γ -glutamyltransferase.

APRESENTAÇÃO DO TEMA

1. INTRODUÇÃO

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. Os compostos fenólicos podem ser encontrados em diversas plantas utilizadas como fitoterápicos, sendo que *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) apresenta elevados níveis destes compostos com propriedades antioxidantes.

O acetaminofen é uma droga amplamente utilizada como analgésico e antipirético. Contudo, quando administrada em altas doses, pode levar a grave lesão hepática e/ou renal. Neste sentido, diversos estudos vêm mostrando formas protetoras contra as lesões hepáticas e renais causadas, tanto pelo acetaminofen, como por outras drogas, que são metabolizadas pelo fígado e/ou rim, levando a produção de compostos menos tóxicos.

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.

O presente estudo teve como objetivo analisar as propriedades bioativas de *Melissa officinalis* na hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzidas por acetaminofen e na ação antiinflamatória na pleurisia induzida por carragenina.

2. PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde os tempos primórdios pela população em geral, surgindo posteriormente os seus empregos nas terapias de diversas enfermidades tanto no preparo de chás e infusões, quanto nas formulações de diversos fármacos. 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). Neste sentido, medicamentos como a morfina, os digitálicos, a quinina e as estatinas foram desenvolvidos direto e indiretamente de fontes naturais (Yunes & Calixto, 2001).

2.1. Família Lamiaceae

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.

O centro de dispersão desta família, anteriormente denominada Labiatae, é provavelmente a região do Mediterrâneo e do Oriente (Joly, 1991; Lorenzi & Mato, 2002), compreendendo ervas ou arbustos que apresentam tricomas glandulares que secretam óleos essenciais e compostos fenólicos, responsáveis pelo aroma característico das espécies (Evans, 2002; Judd et al, 1999).

2.2. Propriedades bioativas de extratos vegetais

As espécies da família Lamiaceae são amplamente utilizadas pela população em geral como a *M. officinalis* que, além de possuir óleos essenciais, apresenta cerca de 0,5 % compostos fenólicos em folhas, como glicosídeos de luteolina, quercetina, ácido caféico e ácido rosmarínico (Barnes et al, 2005), sendo utilizados como antioxidantes (Ribeiro et al, 2001; Herodež, et al, 2003), antiespasmódicos e nos distúrbios gastrintestinais e do sono (Carnat et al, 1998). Existem ainda relatos da ação do óleo essencial de *M. officinalis* como antitumoral (Sousa et al, 2004), além de apresentar efeito na resposta imune humoral e celular em ratos (Drozd & Anuszevska, 2003).

Extratos de *M. officinalis* foram efetivos na redução dos níveis de peroxidação lipídica e na redução nos níveis, tanto de aspartato aminotransferase, quanto da alanina aminotransferase em estudo com ratos hiperlipidêmicos (Bolkent et al, 2005).

Cuppett e Hall III (1998) estudando a atividade antioxidante de Labiatae realizaram a importância de *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Neste estudo os autores citaram os principais efeitos do alecrim, tanto na ação antiinflamatória, anti-séptica, antibactericida, antiviral, quanto na prevenção de câncer e na hepatoproteção.

Uličná et al (2003), trabalhando com extratos aquosos de *Aspalathus linearis* administrados em ratos, observaram o efeito hepatoprotetor contra lesões causadas por tetracloreto de carbono (CCl₄), atribuindo esta proteção a presença de compostos fenólicos, especialmente flavonóides.

Segundo Luper (1998), a espécie vegetal *Silybum marianum*, que possui flavoligninas, tem apresentado diversas aplicações clínicas, como nos casos de hepatite tóxica, lesão isquêmica, além de hepatite viral. Outras plantas também têm sido estudadas quanto ao uso nas diversas desordens do fígado, como a *Camellia sinensis* (chá verde). Da mesma forma, os extratos da raiz de *Angelica sinensis*, do qual foram isolados polissacarídeos, mostraram ter efeito protetor contra lesões hepáticas (Ye et al, 2001).

O extrato de *Sargassum polycystum*, uma alga marinha da família Phaeophyceae, atenuou os níveis de marcadores da lesão hepática no soro induzida por APAP, como a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT) e a fosfatase alcalina (Raghavendran et al, 2004).

A formulação polih herbal HD-3 composta por *Phyllanthus niruri*, *Cichorium intybus*, *Embllica officinalis*, *Tephrosia purpurea* e *Andrographis paniculata*, apresentou efeitos na regeneração e na prevenção de necrose em animais tratados com APAP, indicando sua utilidade no início da patogênese induzida por esta droga (Udupa et al, 2000).

Lin et al (2000), avaliando as atividades antioxidativas e hepatoprotetoras das espécies *Anoectochilus formosanus* e *Gynostemma pentaphyllum*, pertencentes às famílias Orchidaceae e Cucurbitaceae, após a administração do APAP em ratos, relataram uma redução nos níveis da AST e da ALT. O extrato de *Dioscorea alata* protegeu ratos Wistar contra lesão hepática e renal induzida por APAP reduzindo significativamente os níveis de AST, ALT e γ -glutamilttransferase (GGT), além reduzir os níveis de creatinina e de ácido úrico (Lee, et al 2002).

Por outro lado, Shirwaikar et al (2004), relataram o efeito nefroprotetor de extratos de *Aerva lanata* na lesão renal aguda induzida por cisplatina, um antitumoral, e gentamicina, um antibiótico utilizado em uma ampla variedade de bacilos gram-negativos aeróbicos e algumas bactérias gram-positivas em ratos Wistar.

3. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os vegetais produzem uma grande variedade de substâncias que não possuem ação direta na fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, de carboidratos e de lipídeos, sendo considerados compostos produzidos pelo metabolismo secundário (Taiz & Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos fazem parte do metabolismo secundário vegetal ocorrendo, tanto nas formas livres (agliconas), quanto ligadas a açúcares (glicosídeos) e proteínas. Estes compostos são comuns no grupo das angiospermas, praticamente ausentes em algas, e pouco presente em briófitas e pteridófitas (Soares, 2002).

Os compostos fenólicos possuem diversas funções nos vegetais, tais como proteção contra raios ultravioleta, proteção contra insetos e bactérias, controle da ação de hormônios vegetais e como agentes alelopáticos, além de atrair animais com finalidade de polinização.

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). Estes compostos possuem uma estrutura comum de difenilpropanos (C6 – C3 – C6), constituídos de dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado ligados através de três carbonos, os quais se subdividem em seis subclasses como isoflavona, antocianina, flavanona, catequina, flavona e flavonol (quercetina, figura 1) (Ross & Kasum, 2002).

As diferenças individuais de cada grupo resultam da variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificações nos núcleos e pelo grau de metilação e glicosilação, conferindo diversas propriedades aos flavonóides, principalmente com relação à hidrofobicidade das moléculas (Havsteen, 2002).

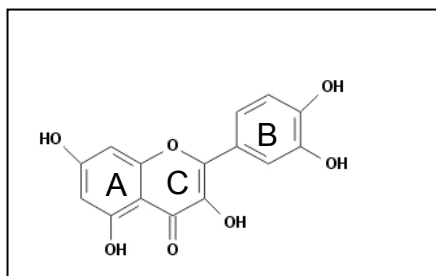


Figura 1: Quercetina (adaptado de Rice-Evans e Packer, 2003).

3.1. Absorção dos compostos fenólicos

Segundo Yang et al (2001), a maioria dos flavonóides absorvidos no intestino é transportada ao fígado, ligados à albumina, através da veia porta. No fígado, os flavonóides e seus metabólitos sofrem metilações e hidroxilações.

Vries et al (2000) cita duas formas de absorção da quercetina, uma na forma de quercetina rutinosídeo e outra na forma glicosilada, onde a primeira forma é absorvida no cólon, enquanto a segunda é absorvida no intestino delgado.

Donovan et al (2001) sugerem que o intestino delgado é o principal órgão envolvido na glicuronidação e na metilação dos flavonóides, enquanto que o fígado apresenta uma importância na sulfatação e nas metilações adicionais. Contudo, Spencer et al (2004) relatam que a glicuronidação *in vivo* pode ocorrer tanto no intestino delgado, quanto no fígado.

3.2. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade varia entre os diferentes compostos fenólicos conforme as propriedades químicas que estes apresentam a desconjugação/ reconjugação no intestino, a absorção intestinal e as enzimas disponíveis para o metabolismo (Yang et al, 2001). O interesse na elucidação do mecanismo de ação de flavonóides *in vivo* tem sido centrado na bioatividade de deglicosilação e do metabolismo resultante de agliconas como a quercetina utilizando como modelo vários tipos celulares como os astrócitos (Spencer et al, 2004).

3.3. Atividade biológica

Os compostos fenólicos apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas benéficas como às ações hepatoprotetoras e antiinflamatórias. Entre eles destacam-se os flavonóides que possuem capacidade de inibir a atividade da monooxigenase, lipooxigenase, ciclooxigenase (Svobodová et al, 2003), oxidoreduases, hidrolases como a hialuronato liase que catalisa a degradação do ácido hialurânico, sendo que em alguns casos as inibições podem ser competitivas, porém em outros podem ser alostéricas (Havsteen, 2002).

Os compostos fenólicos podem também apresentar ação pró-oxidante (Galati et al., 1999; Chan et al., 1999) através de uma ação citotóxica, atuando como compostos anticarcinogênicos *in vivo* (Galati et al, 2002).

Os flavonóides como apigenina, naringenina e naringina podem ter o seu anel aromático oxidado por peroxidases ou co-oxidados pela glutatona, promovendo a formação de radical fenoxil e til, além de espécies reativas de oxigênio (Goldman et al., 1999), promovendo tanto a oxidação de lipoproteínas, quanto a formação de ligações cruzadas entre proteínas que contribuem para a formação de placas ateroscleróticas (Heinecke et al., 1993).

Os flavonóides podem também inibir e/ou modular a atividade dos citocromos P450 (CYPs), aumentando ou reduzindo as concentrações de diversas drogas terapêuticas no plasma. A indução da atividade do CYP pelos flavonóides ocorre através da estimulação direta da expressão do gene via um receptor específico e ou da proteína CYP, ou pela estabilização do mRNA. Os flavonóides podem inibir o metabolismo de xenobióticos através de diversas isoformas do CYP, tais como o *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* e o *CYP3A4*. Eles também podem inibir o CYP de humano dependendo das suas formas estruturais e de suas concentrações (Hodek et al, 2002).

A administração simultânea de drogas e flavonóides podem induzir alterações farmacocinéticas das drogas, levando a um aumento da toxicidade ou ao declínio do efeito terapêutico (Betterweck et al, 2004; Venkataramanan et al, 2000).

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).

3.3.1. Ação antioxidante

Os compostos fenólicos funcionam como seqüestradores (*scavenging*) de radicais livres ou como quelantes de metais, agindo sobre os radicais livres tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Fe^{+3}/Fe^{+2} e o óxido nítrico ($NO\cdot$), através de dois mecanismos: o

primeiro que envolve a inibição da formação de radicais livres, e o segundo que abrange a eliminação de radicais livres (Svobodová et al, 2003; Soares, 2002).

Neste contexto, os compostos fenólicos podem representar importantes agentes preventivos da oxidação, como em hepatócitos expostos ao Fe^{+3} que foram protegidos pela presença de ácidos fenólicos, na qual a cinarina exerceu melhor efeito protetor, quando comparado com o ácido rosmarínico (Psotová et al, 2003).

3.3.2. Ação antiinflamatória

Drogas antiinflamatórias não-esteróides (NSAIDs), são geralmente utilizadas como antiinflamatório, antipirético e analgésico, inibindo a atividade de ciclooxigenase (COX).

Durante a inflamação a carragenina, um polissacarídeo pró-inflamatório, pode induzir o aumento na expressão da ciclooxigenase-2 mRNA (COX-2 mRNA) e proteína COX-2, bem como a produção de prostaglandina E_2 (PGE_2) (Nantel, et al, 1999; Corsini et al, 2005). A COX possui duas isoformas, a COX-1, forma constitutiva e a COX-2, forma induzível, sendo a COX-2, considerada uma enzima pró-inflamatória (Willoughby et al, 2000; Derek et al, 1999).

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de minimizar ou inibir os efeitos inflamatórios, como Pertes et al (1999) que relataram uma ação antiinflamatória do extrato de *Wilbrandia ebracteata* (Curcubitaceae) utilizada no tratamento de diversas doenças, inibindo a produção de prostaglandina E_2 (PGE_2).

Williams (1995) relatou que extrato de *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) pode inibir a ciclooxigenase e a 5-lipooxigenase através da tanetina, um flavonol lipofílico. Este flavonol inibiu um derivado do ácido araquidônico, indicando uma ação antiinflamatória. O mesmo ocorre com outros flavonóides que podem inibir ciclooxigenases, monooxigenases e lipooxigenases através do metabolismo do ácido araquidônico (Rotelli et al, 2003; Svobodová et al, 2003).

O ácido rosmarínico encontrado em diversas plantas medicinais tem apresentado ação antiinflamatória e a capacidade de inibir a 5-lipoxigense, 3R-hidroxiesteróide desidrogenase e peroxidação lipídica como citado por Nakazawa et al (1998), o qual mostrou a excreção do ácido rosmarínico e de seus metabolitos na urina de ratos Sprague

Dawley, 48 horas após a administração de 200 mg/kg da fração de ácido rosmarínico purificada a partir do extrato de *Perillae frutescens* (Lamiaceae).

O ácido rosmarínico é rapidamente eliminado da circulação sanguínea 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 (Pereira, et al 2005; Petersen & Simmonds, 2003).

Paola et al (2005) relataram a ação antiinflamatória do extrato de *Camellia sinensis* (chá verde), o qual reduziu o edema causado pela carragenina, diminuiu os níveis de células polimorfonucleares, os níveis de TNF- α (fator de necrose) e os níveis de NO \cdot .

Também apresentaram ações antiinflamatórias, os extratos de *Loasa speciosa* (Loasaceae) (Badilla et al, 2003), de *Mikania laevigata* (guaco-do-mato) e de *Mikania involucrata* (cipó-sem-nome), os quais reduziram tanto o volume do exsudato, quanto a migração de leucócitos e de células polimorfonucleares na pleurisia induzida por carragenina (Suyenaga et al, 2002).

O interesse por fármacos que apresentem ações antiinflamatórias vem aumentando, por isso é importante conhecer cada vez mais as propriedades bioativas das plantas medicinais, como são absorvidas e metabolizadas, tanto nos humanos, como em outros animais.

4. ACETAMINOFEN COMO AGENTE TERAPÊUTICO E AGENTE TÓXICO

O acetaminofen (APAP) é o nome genérico de *N*-acetil-*p*-aminofenol, largamente utilizado como agente analgésico e antipirético (Dong et al, 2000). O APAP (figura 2) pode ser encontrado tanto em formulações puras, quanto associado a outros fármacos.

Em humanos, o APAP é facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal, ocorrendo picos de concentrações no plasma de 10 a 20 μ g/ml, entre 30 minutos e 2 horas após a administração da dose terapêutica (10 a 15 mg/kg). O risco de toxicidade à ingestão de APAP ocorre com doses entre 140 a 150 mg/kg para crianças ou 7,5 g para adultos, levando a um aumento da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT)

(Anker et al, 1994), quando torna-se um potente agente hepatotóxico, provocando hepatite fulminante que pode ser letal para humanos e outros animais (Lin et al, 2000).

No Reino Unido, cerca de 3.2×10^9 comprimidos de APAP são consumidos todo ano, que é equivalente a uma média de 55 comprimidos/pessoa. Os usos de APAP tanto em altas doses, quanto em baixas doses por longos períodos podem causar hepatotoxicidade, particularmente na presença de outros fatores pré-dispositores, como consumo crônico de álcool, períodos de jejum prolongados e interação droga-droga (Wallace, 2004; Sumioka et al, 2004).

A hepatotoxicidade por APAP tem sido demonstrada tanto em animais experimentais quanto em casos clínicos. Camundongos e hamsters parecem ser muito sensíveis aos efeitos hepatotóxicos do APAP, desenvolvendo necrose centrolobular fulminante similar ao observado em humanos. Ratos, coelhos e porquinhos da índia parecem ser relativamente resistentes à lesão induzida pelo APAP (Donald et al, 1974), embora diversos estudos utilizem ratos e camundongos como modelos de hepatotoxicidade induzidas por APAP.

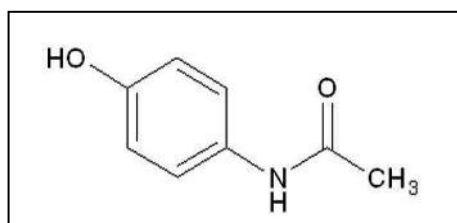


Figura 2: Acetaminofen (adaptado de O'Neil et al, 2001.)

4.1. Bioativação do acetaminofen

O APAP em doses terapêuticas é rapidamente metabolizado pelo fígado, principalmente através de glicuronidação e sulfatação. Pode também, ser oxidado pelo citocromo P450 (*CYP2E1*). Neste último caso, produz intermediário citotóxico, *N*-acetil-*p*-benzoquinona-inamina (NAPQI), que é rapidamente conjugado pela glutathione (GSH) hepática, resultando na formação de um inofensivo produto solúvel em água, o ácido mercaptúrico.

Assim como no fígado, a ação do citocromo P450 (*CYP*) no rim produz NAPQI (Bessems e Vermeulen, 2001), o qual é conjugado pela GSH renal (Dekant, 2001). A

depleção da GSH, tanto hepática quanto renal, leva a citotoxicidade do APAP (Stern et al, 2005; Donald et al, 1974).

4.2. Hepatotoxicidade provocada por acetaminofen

O fígado é um importante órgão alvo da toxicidade de drogas e de xenobióticos, os quais são absorvidos diretamente pelo intestino e transportados através do sangue portal para o fígado na forma concentrada. A lesão hepática envolve processos de peroxidação lipídica, de permeabilidade das membranas celulares, modificação das atividades das enzimas ligadas às membranas e às proteínas de transporte, além de estar envolvida com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Jaeschke et al, 2002).

O fígado de humanos apresenta várias isoformas do citocromo P450 (CYP), entre elas: *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* e o *CYP1A2*, que são responsáveis pelo metabolismo de drogas. As isoformas de CYP estão envolvidas nas reações de inativação ou ativação de agentes terapêuticos, na conversão de produtos químicos em moléculas altamente reativas, podendo levar a mutações e a morte celular, estão relacionadas, também, com a inibição ou indução enzimática, que resulta em interações droga-droga (Devlin, 2003; Dong et al, 2000, Weide & Steijns, 1999).

A glicuronidação e sulfatação são excedidas após altas doses de APAP e uma grande quantidade de NAPQI, um radical livre, é formado via citocromo P450 (*CYP2E1*), o qual é conjugado pela glutathione (GSH) hepática, formando o ácido mercaptúrico. Após a glutathione ser esgotada, ocorre à conjugação da NAPQI às proteínas dos hepatócitos, resultando em lesão hepática, podendo-se dizer que a GSH tem um papel fundamental na proteção contra a hepatotoxicidade induzida por APAP (James et al, 2003; Waters et al, 2001; Plewka et al, 2000).

Doses farmacológicas de GSH aceleram a recuperação nos níveis de glutathione mitocondrial, que sequestra o peroxinitrito e protege contra a lesão celular. Esses dados sugerem que o peroxinitrito é um mediador crítico da hepatotoxicidade de APAP. Neste sentido, a inibição da formação do peroxinitrito por inibidores de síntese de $\text{NO}\cdot$ foi associado com a diminuição do efeito hepatotóxico do APAP (Bajt et al, 2003; Knight et al, 2002).

As intoxicações por APAP em humanos e em outros animais podem ser caracterizadas pelos elevados níveis de transaminases devido à necrose hepática e a hemorragia centrilobular (Ito et al, 2004).

O efeito hepatotóxico em ratos submetidos a doses repetidas do APAP pode ser avaliado utilizando-se marcadores de estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA), substância ácida reativa tiobarbitúrico (TBARS) e alanina aminotransaminase (ALT), bem como através da determinação do estado antioxidante dos hepatócitos, como a glutatona (GSH), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (O'Brien et al, 2000).

A administração de 300 mg/kg de APAP intraperitoneal (i.p.) em camundongos provocou lesão hepática, tendo os animais apresentado um aumento dos níveis de alanina aminotransaminase (ALT) no plasma entre 4 a 24 horas após a administração (Lawson et al, 2000). Segundo James et al (2003) os níveis de alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) pode aumentar após 4 horas da administração do APAP. As doses hepatotóxicas do APAP podem variar conforme o método de administração, utilizando-se doses mais elevadas quando administrada oralmente.

Smith et al (1998) verificaram que a administração de 650 mg/kg de APAP em ratos promove lesões hepáticas, através do aumento nos níveis de ALT após 24 horas da administração da droga.

A administração tanto de N-acetilcisteína (NAC), uma cisteína pró-droga, quanto de inibidores de *CYP2E1* e de antioxidantes protegem o fígado contra a toxicidade induzida por APAP (Sumioka et al, 2004; Bessems & Vermeulen, 2001).

O óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) parece ter ações protetoras, incluindo a supressão da síntese de várias citocinas pró-inflamatórias, uma vez que em baixas concentrações, possui efeito protetor contra a indução de danos pelo fator- α de necrose tumoral (TNF α) ou contra a morte celular programada (apoptose) (Wallace, 2004).

O $\text{NO}\cdot$ pode reagir com o radical livre superóxido e formar o potente oxidante, peroxinitrito, importante mediador da necrose de células do fígado (Knight et al, 2002). A utilização de inibidores da iNOS, como a aminoguanidina, protege o fígado contra a inflamação ou lesão induzida por APAP (Kamanaka et al, 2003).

4.3. Nefrotoxicidade provocada por acetaminofen

Dekant (2001) demonstrou a nefrotoxicidade de xenobióticos e de seus metabólitos no metabolismo renal, na qual a conjugação com glutathiona (GSH) apresenta um importante papel na destoxicação de xenobióticos.

A nefrotoxicidade pode ser caracterizada pelo aumento nos níveis da γ -glutamyltransferase (GGT) e creatinina no soro (Lee et al, 2002).

A toxicidade renal é principalmente causada pela biotransformação catalisada pela *CYP2E1* (Hu et al, 1993), uma isoforma do citocromo P450, que está envolvida na inativação ou na ativação de agentes terapêuticos e na conversão de produtos químicos em moléculas altamente reativas, podendo levar a mutações e a apoptose celular (Devlin, 2003).

O consumo em altas doses acetaminofen APAP pode provocar tanto necrose hepática centrolobular, quanto necrose renal no túbulo proximal (PT). Além disso, nem sempre a lesão renal aguda ocorre simultaneamente com a hepática em humanos (Bessems & Vermeulen, 2001).

Neste sentido, podemos dizer que, tanto no fígado quanto no rim existem diferentes isoformas da CYP, podendo apresentar diferentes atividades na biotransformação do APAP em produtos citotóxicos.

As isoformas *CYP2E1*, *CYP2C11* e *CYP2B1/2* foram expressas em baixos níveis no rim, quando comparadas aos níveis encontrados no fígado de ratos. Enquanto que os níveis da *CYP4A2/3* foram equivalentemente expressados em ambos os tecidos, os níveis expressos de *CYP2E1* nos microssomas do túbulo distal (DT) não foram tão aumentados quanto nos microssomas do PT. Enquanto que a *CYP2C11* foi altamente expressa no PT. Contudo, a *CYP2B1/2* foi expressa equivalentemente em ambas as células do PT e do DT. A *CYP3A1* não foi detectada em nenhum tipo celular e a *CYP4A2/3* foi detectada tanto nos microssomas cortical, como nos microssomas no PT e DT (Cummings, et al 1999).

A administração de uma elevada dose do APAP em ratos Fischer (F344) e em camundongos CD-1 causou necrose renal aguda no túbulo proximal. Em ambas as espécies, a administração do acetaminofen resultou na depleção renal da glutathiona (GSH). No entanto, cabe ressaltar que as vias metabólicas do APAP diferem significativamente entre ratos e camundongos (Bessems & Vermeulen, 2001).

Hart et al (1994), estudando camundongos CD-1 castrados mostraram um efeito protetor contra a nefrotoxicidade induzida por APAP, embora, não tivessem apresentado hepatotoxicidade.

O estudo com camundongos fêmeas CD-1 e C3H/HeJ pré-tratadas com testosterona mostrou um aumento na toxicidade renal induzida por APAP, sendo esta correlacionada com a indução da *CYP2E1* renal (Hu et al,1993).

Tarloff et al (1996) mostraram que o gênero e a idade dos ratos podem estar relacionados à hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade, na qual ratos machos são mais susceptíveis a hepatotoxicidade, enquanto ratos fêmeas são mais susceptíveis a nefrotoxicidade.

Slitt et al (2005) demonstraram que a ribose cisteína, uma pró-droga cisteína que protege contra a toxicidade hepática e renal induzida por APAP, por ser uma facilitadora da biossíntese de GSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anker AL, Smilkstein MJ. Acetaminophen: Concepts and Controversies. *Emergency Medicine Clinics of North America* 12(2): 335-49, 1994.

Bajt ML, Knight TR, Farhood A, Jaeschke H. Scavenging peroxynitrite with glutathione promotes regeneration and enhances survival during acetaminophen-induced liver injury in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(1):67-73, 2003.

Badilla B, Arias AY, Arias M, Mora GA, Poveda LJ. Anti-inflammatory activities of *Loasa speciosa* in rats and mice. *Fitoterapia*, 74:45-51, 2003.

Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Plantas medicinales: guía para los profesionales de la salud*. Barcelona 1ª ed. 2005: Pharma editors, 568. p

Bessems JGM, Vermeulen NPE. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(1):55-138, 2001.

Bolkent S, Yanardag R, Karabulut-Bulan O, Yesilyaprak B. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study. *Journal Ethnopharmacology*, 99:391-8, 2005.

Betterweck V, Derendorf H, Gaus W. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Are Preventive Screenings Necessary and Appropriate? *Planta Med*, 70:784-791, 2004.

Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72: 301-5, 1998.

Chan T, Galati G, O'Brien PJ. Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chem. Biol. Interac*, 122:15-25, 1999.

Corsini E, Paola RD, Viviani B, Genovese T, Mazzon E, Lucchi L, Marinovich M, Galli CL, Cuzzocrea S. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rat. *Blackwell Publishing Ltd; Immunology*, 115:253-261, 2005.

Cummings BS, Zangar RC, Novak RF, Lash LH. Cellular distribution of cytochromes P-450 in the rat kidney. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(4): 542-48, 1999.

Cuppett SL, Hall III CA. Antioxidant activity of the Labiatae. *Advances in food and nutrition research*, 42:245-71, 1998.

Dekant W. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. *Toxicology Letters*, 124: 21-36, 2001.

Derek W, Gilroy, PR, Colville-Nash D, Willis J, Chivers MJ, Paul-Clark, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine*, 5:(6), 1999.

Devlin TM. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 5^a ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2003. 1084 p.

Donald CD, Potter WZ, Jollow David, Mitchell JR. Species differences in hepatic glutathione depletion covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sciences*, 14:299-2109, 1974.

Dong H, Haining RL, Hummel KE, Rettie AE, Nelson SD. Involvement of human cytochrome p450 2d6 in the bioactivation of acetaminophen. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(12):1397-1400, 2000.

Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A et al. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *American Society for Nutritional Sciences*, 131:1753-7, 2001.

Drozd J, Anuszevska E. The effect of the *Melissa officinalis* extract on immune response in mice. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 60(6):467-70, 2003.

Evans, WC. *Trease and Evans: Pharmacognosy*. 15th ed. London: W.B. Saunders, 2002. 585 p.

Galati, G, Chan, T, Wu B, O'Brien PJ, Glutathionedependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol*, 12: 521–525, 1999.

Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177: 91–104, 2002.

Goldman R, Claycamp GH, Sweetland MA, Sedlov AV, Tyurin VA, Kisin ER, Tyurina YY, Ritov VB, Wenger SL, Grant SG, Kagan VE. Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9/10):1050–1063, 1999.

Hart SGE, Beierschmitt WP, Wyand DE, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. I Evidence of role for in situ activation in selective covalent binding and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 126: 267-75, 1994.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Farmacology & Therapeutics*, 96:67-202, 2002.

Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyses the oxidative cross-linking of proteins. *The Journal of clinical investigation*, 91:437–444, 1993.

Herodež ŠS, Hadolin M, Škerget M, Željko K. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80:275-82, 2003.

Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139:1-21, 2002.

Hu JJ, Lee MJ, Vapiwala M, Reuhl k, Thomas PE, Yang CS. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. *Toxicology and applied pharmacology*, 122:16-26, 1993.

Ito Y, Abril E, Bethea, NW, McCuskey RS. Role of nitric oxide in hepatic microvascular injury elicited by acetaminophen in mice. *American Journal Gastrointest Liver Physiol*, 286:G60-G67, 2004.

Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum A I, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Forum - Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65:166-76, 2002.

James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12):1499-1506, 2003.

James LP, McCulloch SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetoaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicological Sciences*, 75:458-67, 2003.

Joly AB. 1991. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional. 777p., il.

Judd WS. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2. ed. Sunderland: Editora Sinauer Associates. 1999. 464 p.: il.

Kamanaka Y, Kawatbata A, MatsuyA H, Taga C, Sekiguchi F, Kawao N. effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Life Sciences*, 74(6):793-802, 2003.

Knight TR, Ho Y-S, Farhood A, Jaeschke H. Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2):468-75, 2002.

Lawson JA, Farhood A, Hopper RD, Bajt ML, Jaeschke H. The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. *Toxicological sciences*, 54: 509-16, 2000.

Lee SC, Tsai CC, Chen JC, Lin JG, Lin CC, Hu ML, Lu S. Effects of “Chinese yam” on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(6):503-8, 2002.

Lin C, Huang PC, Lin JM. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *American Journal of Chinese Medicine*, 28(1):87-96, 2000.

Lorenzi H, Mato FJA *Plantas medicinais no Brasil: nativas ou exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512 p.

Luper SND. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. *Alternative Medicine Review*, 3(6):410-21, 1998.

Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats. *Journal of Natural Products*, 61(8):993-996, 1998.

Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirinon M, Metters KM, Chan CC. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of pharmacology*, 128:853-59, 1999.

O'brien PJ, Slaughter MR, Swain A, Birmingham JM, Greenhill RW, Elcock F et al. Repeated acetaminophen dosing in rats: adaption of hepatic antioxidant system. *Human & Experimental Toxicology*, 19(5):277-83, 2000.

O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 13. ed. USA: Merck, 2001. 2500p.

Paola PD, Mazzon E, Muià C, Genovese T, Menegazzi M, Zaffini R, Suzuki H, Cuzzocrea S. Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. *Respiratory Research*, 29;6(1):66, 2005.

Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Brum LFS, Picada JN, Ardenghi. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological*, 52:199-203, 2005.

Pertes RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, Brum-Fernandes AJ, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sciences*, 64(26):2429-37, 1999.

Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62:121-25, 2003.

Plewka A, Zielinska-Psuja B, Kowalowka-Zawieja J, Nowaczyk-Dura G, Plewka D, Wiaderkiewicz A et al. Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4):1129-36, 2000.

Psotová J, Lasovsky J, Vičar J. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoproctive of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147(2):147-53, 2003.

Raghavendran HRB, Sathivel A, Devaki T. Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen induced hepatic oxidative stress. *Journal of Health Science*, 50(1):42-6, 2004.

Ribeiro MA, Bernado-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.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22:19-34, 2002.

Rotelli AE, Guardiã T, Juárez AO, Rocha1 NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, 48: 601–606, 2003.

Shirwaikar A, Issac D, Malini S. Effect of *Aerva lanata* on cisplatin and gentamicin model of acute renal failure. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 81-6, 2004.

Slitt AML, Dominick PK, Roberts JC, Cohen SD. Effect of ribose cysteine pretreatment on hepatic and renal acetaminophen metabolite formation and glutathione depletion. *Basic & Clinical Pharmacology & toxicology*, 96:487-94, 2005.

Smith GS, Nadiig D, Kokoska ER, Solomon H, Tiniakos DG, Miller TA. Role of neutroohilis in hepatotoxicity induced by oral acetaminophen administration in rats. *Journal of Surgical Research*, 80:252-8, 1998.

- Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15 (1):71-81, 2002.
- Sousa AC, Aliviano DS, Blank AF, Alves PB, Aliviano CS, Gattass CR. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 56(5):677-81, 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.
- Stern ST, Bruno MK, Hennig GE, Horton RA, Roberts JC, Cohen SD. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice:I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202:151– 159.
- Sumioka I, Matsura T, Yamada K. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: still an important issue. *Yonago Acta Medica*, 47:17-28, 2004.
- Suyenaga ES, Reche E, Farias FM, Schapoval EES, Chaves CGM, Henriques AT. Antiinflammatory Investigation of Some Species of *Mikania*, *Phytotherapy Research*, 16:519–523, 2002.
- Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers*, 147(2):137-45, 2003.
- Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. 3^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004. 719 p.
- Tarloff JB, Khairallah EA, Cohen SD, Goldstein RS. Sex-and age-dependent acetaminophen hepato- and nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats: role of tissue accumulation, nonprotein sulfhydryl depletion, and covalent binding. *Fundamental and Applied Toxicology*, 30:13-22, 1996.

Udupa V, Kulkarni KS, Rafiq Md, Gopumadhavan S, Venkataranganna MV, Mitra SK. Effect of HD-O3 on levels of various enzymes in paracetamol-induced liver damage in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 32:361-4, 2000.

Uličná O, Greksák M, Vančová O, Zlatoš L, Galbavý Š, Božek P et al. Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl4-induced liver damage in rats. *Physiological Research*, 52:461-6, 2003.

Venkataramanan R, Ramachandran V, Komoroski BJ, Zhang S, Schiff PL, Strom SC. Short Communication. Milk Thistle, a Herbal Supplement, Decreases the Activity of CYP3A4 and Uridine Diphosphoglucuronosyl Transferase in Human Hepatocyte Cultures. *Drug metabolism and disposition*, 28(11):1270-73, 2000.

Vries JHM, Hollman PCH, Amersfoort IV, Olthof MR, Katan MB. Red wines is a poor source of bioavailable flavonoids in men. *Journal of the American Dietetic Association*, 745-8, 2000.

Wallace JL. Acetaminophen Hepatotoxicity: NO to the Rescue. *British Journal of Pharmacology*, 143:1-2, 2004.

Waters E, Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Kay E, Bouchier-Hayes D. Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. *American Journal Gastrointest Liver Physiol*, 280:G1274-G1279, 2001.

Weide JVD, Steijns LW. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Annals of Clinical Biochemistry*, 36:722-29, 1999.

Williams CA, Hoult JRS, Harborne JB, Greenham J, Eagles J. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, 38: (1) 267- 270, 1995

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR, Gilroy D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 1131–1135.

Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21:381-406, 2001.

Ye YN, Liu ESL, Li Y, So HL, Cho CCM, Sheng HP et al. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. *Life Sciences*, 69:637-46, 2001.

Yunes RA, Calixto JB. *Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. SC: ARGOS editora universitária, 2001. 523p..

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar as propriedades bioativas dos extratos de *Melissa officinalis* L. através do efeito hepato e nefroprotetor e da ação antiinflamatória em ratos Wistar.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito hepatoprotetor e nefroprotetor em animais pré-tratados com extratos aquosos de *Melissa officinalis* nas doses 500 e 250 mg/kg administrado via intragástrica e na dose 200 mg/kg administrado via intraperitoneal na toxicidade induzida por acetaminofen.
- Avaliar o efeito antiinflamatório dos extratos aquosos de *Melissa officinalis* nas doses 200, 100 e 50 mg/kg administrado via intraperitoneal na pleurisia induzida por carragenina em ratos Wistar.

Article I**The effect of extract of *Melissa officinalis* L. on protection against hepatic and renal lesion induced by acetaminophen**

Denise Pereira Müzell, Rodrigo Medeiros Fagundes, Vasyl C. Saciura, Carlos Luiz Reichel
Jarbas Rodrigues de Oliveira, Leandro Vieira Astarita

Laboratório de Pesquisa em Biofísica e Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga 6681 prédio 12C salas 263 e 253 – Porto Alegre/RS – Brasil.

Abstract

Acetaminophen (APAP) is widely used as an analgesic and antipyretic drug. However, when consumed in high doses it can cause centrilobular hepatic necrosis and/or renal necrosis. The Lamiaceae family contains several species, among them *Melissa officinalis* (L.), which have high levels of phenolic compounds, with anti-oxidant action. However, the simultaneous administration of drugs and extracts rich in polyphenols can induce pharmacokinetic alterations in the drugs. This study attempt to analyse the bioactive properties of extracts of *M. officinalis* in the protection against hepatic and renal lesion induced by acetaminophen. Male Wistar rats were used as models in the experiments. They were pre-treated for seven days with aqueous extracts of *Melissa officinalis* administered at doses of 500 and 250 mg/kg or saline solution intragastric and saline solution or APAP intraperitoneal (ip). The aqueous extracts administered contained high levels of phenolic compounds and quercetin flavonoids. The group pre-treated with saline and administered APAP showed a significant increase in aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels, when compared with the saline solution + saline solution group. The highest levels of AST and ALT were observed on animals pre-treated with extracts 250 mg/kg ig. + APAP ip., when compared with saline solution + APAP and 500 mg/kg of extract ig + APAP ip. The increase in the levels of biochemical hepatic lesion markers was not accompanied by the presence of necrosis in the centrilobular region during histopathological analysis. Analysis of renal lesion marker indicated an increase in levels of γ -glutamyltransferase (GGT) in the urine in the group saline solution + APAP group, when compared with the saline solution + saline solution group. The levels of GGT in the urine of the groups pre-treated with extracts that later received APAP were not different from those of the saline solution + APAP group, suggesting there was no protective effect. Administration of extracts ig. prior to APAP did not show protective effect concerning the levels of AST, ALT and GGT. It suggests that *M. officinalis* is not hepatic and nephroprotective against lesion induced by APAP.

Key Words: phenolic compounds, flavonoids, acute hepatic injury, hepatoprotective effect, acute renal injury, acetaminophen, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, γ -glutamyltransferase.

1. INTRODUCTION

Acetaminophen (APAP), commonly known as paracetamol, is widely used as an analgesic and antipyretic drug (1), and can be found both in pure formulations and as a constituent in a number of medicines.

The consumption of high doses of this drug can cause centrilobular hepatic necrosis, as it is a powerful hepatotoxic agent (2), as well as provoke renal necrosis in the proximal tubule (PT), with a significant reduction in glomerular filtration (3). However, the acute renal lesion does not always occur simultaneously with the hepatic lesion (4).

Hepatic lesion caused by APAP is not only associated with high doses, but also with the chronic use at low concentrations, particularly in the presence of other pre-disposing factors, such as chronic alcohol consumption, periods of fasting, and drug-drug interaction during prolonged treatment (5, 6).

APAP hepatotoxicity can be characterised by an increase in levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), due to centrilobular necrosis and haemorrhage (7). As in the liver, the action of the P450 cytochrome in the kidney produces an intermediary cytotoxin, N-acetylbenzoquinoneimine (NAPQI) (3), which is quickly conjugated by the renal glutathione (GSH) (8). GSH depletion, either hepatic or renal, leads to APAP cytotoxicity (9, 10). The renal lesion caused by APAP can be characterised by an increase in the urine levels of γ -glutamyltransferase (11).

A number of studies have demonstrated the hepatic and renal protective action of vegetable extracts, like *Aspalathus linearis* (12), *Silybum marianum* (13) and *Dioscorea alata* (11), leading to a reduction in the levels of biochemical markers of injury.

Among the constituents of vegetable extracts that show bioactivity, the phenolic compounds have a recognised hepatoprotective and anti-inflammatory action (14). *Melissa officinalis* (L.) (lemon balm) has been used in the treatment of several diseases (15, 16, 17,18), and has elevated levels of polyphenols, which represent the fraction with the greatest biological activity (19). This species possesses about 0.5% of phenolic compounds like quercetin and rosmarinic acid (20), having antioxidant (21,22), antispasmodic properties, used in sleep disturbances (23) and anti-tumour activity (24). Besides the direct effects of the polyphenols, the simultaneous administration of drugs and polyphenols can

induce pharmacokinetic alterations in the drugs, leading to increased toxicity or diminished therapeutic effect (25, 26).

The intention herein, is to assess the effect of aqueous extracts of *M. officinalis* in the protection against hepatic and renal lesion induced by acetaminophen.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Source plants of *Melissa officinalis* were cultivated in a nursery with regular watering, and later taken to the laboratory fifteen days prior the start of the experiments. The plants were kept at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a 16 hour photoperiod and regular watering.

Fifty grams (50g) of leaves were collected and mashed with distilled water (1:5 w/v). After, the mash was filtered in paper with the aid of a vacuum pump. The extract was then centrifuged at $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes at 4,500 xg. The supernatant was then stored at -20°C until its use.

2.2. Animals

Male Wistar rats, weighing 215 – 325 g, supplied by the university animal house, were used in the experiment. They were taken to the laboratory three days prior to the start of the experiments. Animals were housed on a 12h light:dark cycle in a temperature-controlled room with free access to water and food. The animals were cared for and used in accordance with the “Guiding Principles in the Care and Use of Animals” approved by the Council of the American Physiological Society (27).

The animals were pre-treated via intragastrically (ig) for seven days with 5 mL/kg of saline solution or aqueous extract of *Melissa officinalis*, at concentrations of 500 mg/kg (1:10 w/v) and 250 mg/kg (1:20 w/v).

On the sixth day of the pretreatment, the animals were transferred to metabolic cages with free access to water, where they remained for 48 hours. During this period, food was withdrawn 16 hours prior to the last administration of the aqueous extract or saline solution (pretreatment).

Soon after the last intragastric administration of the pretreatment, Tylenol[®] (acetaminophen – APAP), at a concentration of 800 mg/kg (4 mL/kg) or saline solution (control treatment) was administered via intraperitoneal (ip). Blood samples were collected from the animals prior to the start of the pretreatment and 24 hours after the treatment with APAP or saline solution. Urine samples were also collected from the animals 24 hours before and after the treatment with APAP or with saline solution.

The effect of the intraperitoneal administration of the extract was also assessed. The animals used in the experiment were kept for 24 hours in metabolic cages with free access to water and food. After 24 hours with standard chow, the blood and urine was collected and the animals were kept for 16 hours without access to food. At the end of this test period, 200 mg/kg (2 mL/kg) of extract was administered ip. After 30 minutes, 800 mg/kg of APAP was administered ip. The collection of blood and urine samples from the animals 24 hrs after the administration of APAP.

All animals were maintained under adequate light and temperature conditions. The animals were divided into six groups of five animals each, in the following manner (pretreated for seven days + treated): A) saline solution ig + saline solution ip group; B) saline solution ig + APAP ip group; C) 500 mg/kg of extract ig + saline solution ip group; D) 500 mg/kg of extract ig + APAP ip group; E) 250 mg/kg of extract ig + APAP ip group; There was also the intraperitoneal group (F group), which consisted in 200 mg/kg of extract ip and APAP ip.

2.3. Quantification of the phenolic compounds and quercetin flavonoids in the extracts

Phenolic compound levels were assessed by means of the colorimetric technique using Folin-Ciocalteu (ImprintSul Ltda.) reagents and 20% Na₂CO₃, in a spectrophotometer. Absorbancy (765nm) was determined after 30 minutes incubation at 25 °C in the dark (28). Gallic acid was used as standard in order to establish the calibration curve.

Quercetin flavonoids levels were determined by means of the colorimetric technique, using the reaction with 96% alcohol, 10% aluminium nitrate and potassium acetate 1M. Absorbancy (415 nm) was determined in a spectrophotometer after 5 minutes (29). Quercetin was used as standard in order to establish the calibration curve.

2.4. Biochemical analysis of hepatic and renal lesion markers

Rats were anesthetized with 2 mL/kg of Vertanacol[®] (ketamine) and Anasedan[®] (xylazine) (3:1) and the blood samples were collected from the animals through retroorbital sinus puncture, in heparinized microtubes and centrifuged for 15 minutes at 1,500 xg, before treatment and after intragastric pretreatment and intraperitoneal treatment. The serum samples fraction was separated and stored -20 °C.

In order to confirm the hepatotoxicity of the APAP the biochemical markers alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were analysed using commercial kits – Labtest Diagnóstica S. A., Brasil, and the absorbancy read in a spectrophotometer (505 nm), according to the methods of (30).

In order to analyse the nephrotoxicity of the APAP urine samples were collected 24 hours before and 24 hours after the administration of APAP, and centrifuged for 10 minutes at 500 xg.

Following the administration of APAP or saline solution ip, the renal injury were analysed through the urinary excretion of γ -glutamyltransferase (GGT), quantified by the kinetic method, using commercial kit – Labtest Diagnóstica S. A., Brasil. Later the GGT concentrations were calculated by the urinary volume in 24 hours.

2.5. Histological analysis

In order to collect the liver, the animals were sacrificed using a guillotine. Following removal, the liver was fixed in a 10% buffered formaldehyde solution, dehydrated in graded series of alcohol concentrations, xylene and then imbibed in paraffin, using a LEICA TP 1020 tissue preparer. The paraffin blocks were sliced into 5 μ m sections with a microtome, which were then placed on slides for microscopy. The slices were coloured using the Hematoxylin-eosin (H&E) technique and later mounted in Canada balsam and coverplated. Once the Canada balsam was dry, each coloured slide was examined under a microscope in order to observe and analyse the hepatic parenchymatous structure (hepatocytes) from the centrolobular region of the control and experimental animals.

2.6. Statistical analysis of the data

The results presented herein were obtained through the mean and the standard deviation. In order to analyse the differences between the serum hepatic liberation of AST, ALT and between the concentrations urinary of GGT, one-way variance analysis (ANOVA) and the Tukey-Kramer *post-hoc* test were used, with a significance level of $P \leq 0.05$.

The homogeneity of the groups was verified by applying the Kolmogorov-Smirnovski test, with $P \geq 0.05$. In order to perform these tests, version 11.5 SPSS software was used. When necessary, data were transformed by $\sqrt{x+1}$ in order to homogeneity of variancer.

3. RESULTS

The aqueous extracts of *M. officinalis* presented high levels of phenolic compounds (pc) and quercetin flavonoids (qf). In the 100 mg of leaves of *M. officinalis* there is 0.35 mg of pc (0.35 %) and 0.144 mg of qf (0.14 %).

In the 500 mg/kg of extract ig + saline solution group (Figures 1 and 2) there was no significant difference in serum levels of AST and ALT (67 U/L and 24,7 U/L, respectively), when compared with the saline solution + saline solution group (72,5 U/L and 23 U/L, respectively) indicating that the aqueous extract of *M. officinalis* is not hepatotoxic. The levels of AST and ALT in the saline solution + APAP group (122,1 U/L and 47 U/L, respectively) were higher than those seen in the saline solution + saline solution group (Figures 1 and 2).

There was no difference in the levels of AST and ALT between the groups: 250 mg/kg of extract ig + APAP and 200 mg/kg of extract ip + APAP (270,8 U/L and 279 U/L, respectively for AST and 68,25 U/L and 70,77 U/L, respectively for ALT). However, there were differences in these groups when they are compared with the saline solution +APAP (Figures 1 and 2).

The 500 mg/kg of extract ig + APAP group had lower levels of AST and ALT (162,75 U/L and 39,50 U/L, respectively) than the groups that received less concentrated doses of the extract + APAP (Figures 1 and 2). However, there was no difference between this group and the saline solution + APAP group.

The increase in the serum levels of AST and ALT of the animals treated with lower concentrations of extract and that received APAP, may indicate an increase in the hepatotoxicity induced by APAP. However, the histopathological analysis did not show the presence of necrosis in the centrilobular region of the hepatic parenchyma, indicating that the increase in serum levels of transaminases can not always be histologically certified (Figure 3).

There was increase in the urine levels of GGT (Figure 4) in the saline solution + APAP group (375.1 mU/24hs), when compared with the saline solution + saline solution group (4.6 mU/24hs), indicating that the APAP was nephrotoxic (Figure 4). The 500 mg/kg of extract ig + saline solution group (2.5 mU/24hs) showed no difference when compared with the saline solution + saline solution group, indicating that the extract is not nephrotoxic.

The levels of GGT on the pretreatments with 500 mg/kg ig. (72.5 mU/24hs) and 250 mg/kg ig. (1,160.3 mU/24hs) + APAP were not different from the saline solution + APAP group (Figure 4). However, pretreatments with 200 mg/kg ip. + APAP increased the level of GGT in urine, indicating a nephrotoxic effect.

4. DISCUSSION

APAP hepatotoxicity can be characterised by an increase in levels of AST and ALT, due to centrilobular necrosis and haemorrhage (7). As in the liver, the action of the P450 cytochrome in the kidney produces an intermediary cytotoxin (NAPQI), a free radical (3) which is quickly conjugated by glutathione (GSH) (8). GSH depletion, either hepatic or renal, leads to APAP cytotoxicity (9, 10).

Several species of medicinal plants display hepatoprotection. Extracts of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum* (Orchidaceae and Cucurbitaceae, respectively) lead to a reduction in the levels of AST and ALT after the administration of APAP in rats (2). Studies with extract of *Dioscorea alata* (Dioscoreaceae), a species that has presents high levels of antioxidant activity, displayed a protective effect against hepatic and renal injury induced by APAP, reducing the levels of serum AST, ALT and GGT (11). The same was observed with extracts of *Rosmarinus*

officinalis (rosemary), *Aspalathus linearis* and *Sargassum polycystum* that presented hepatoprotective activities (12, 31, 32). *Silybum marianum* (milk thistle), *Curcuma longa* (curcuma) and *Camellia sinensis* (green tea) have several clinical applications, such as cases of toxic and viral hepatitis (13). Similarly, extracts obtained from the roots of *Angelica sinensis* have been shown to have a protective effect against hepatic injury (33).

In the present study it has been shown that extracts of *M. officinalis* is not hepatotoxic and presents high levels of phenolic compounds and quercetin flavonoids, as previously reported (20), conferring this species an antioxidant effect (21, 22) and probably a protective effect against hepatic and renal injury induced by APAP.

Administration of APAP led to increases in the serum levels of both AST and ALT. Besides, the doses 200 mg/kg ip. + APAP and 250 mg/kg ig. + APAP presents an increase of serum AST and ALT, showing rise toxicity. Probably, this happen because there was an induction of cytochromes P450 activity and this provoke a synthesis of the intermediary citotoxic NAPQI, a free radical. However, there was no difference between the group 500 mg/kg ig + APAP and saline solution + APAP, and this is unclear.

Renal GSH depletion leads to APAP cytotoxicity (9, 10), which can be characterised by an increase in the urine levels of GGT (11).

APAP administration leads to increase the GGT levels in urine; however, this difference was not significance. The highest level of GGT was observed when APAP was administered with extract 200 mg/kg ip. It suggests that extracts of *M. officinalis* increased the toxic effect of APAP. This effect may be attributed by induction of renal cytochromes P450 like in at the liver.

The administration of drugs together with flavonoids, may induce pharmacokinetic alterations in the drugs, which could lead to increased toxicity or a diminished therapeutic effect (26, 34). Further studies are necessary in order to clarify the action of extracts in the cytochrome P450 activity.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Antônio Atalíbio Hartmann, Dr. Antônio Carlos Araujo de Souza, Dra. Eliane Diefenthal Heuser, Dra. Clarisse Azevedo Machado.

6. REFERENCES

- 1- Dong H, Haining RL, Hummel KE, Rettie AE, Nelson SD. Involvement of human cytochrome p450 2d6 in the bioactivation of acetaminophen. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(12):1397-1400.
- 2- Lin C, Huang PC, Lin JM. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Am J Chin Med* 2000; 28(1):87-96.
- 3- Bessems JGM, Vermeulen NPE. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Crit Rev Toxicol* 2001; 31(1):55-138.
- 4- Tarloff JB, Khairallah EA, Cohen SD, Goldstein RS. Sex-and age-dependent acetaminophen hepato- and nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats: role of tissue accumulation, nonprotein sulfhydryl depletion, and covalent binding. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 30:13-22.
- 5- Wallace JL. Acetaminophen Hepatotoxicity: NO to the Rescue. *Br J Pharmacol* 2004; 143:1-2.
- 6- Sumioka I, Matsura T, Yamada K. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: still an important issue. *Yonago Acta Med* 2004; 47:17-28.
- 7- Ito Y, Abril E, Bethea, NW, McCuskey RS. Role of nitric oxide in hepatic microvascular injury elicited by acetaminophen in mice. *American Journal Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G60-G67.
- 8- Dekant W. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. *Toxicol Lett* 2001; 124: 21–36.

- 9- Stern ST, Bruno MK, Hennig GE, Horton RA, Roberts JC, Cohen SD. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202:151–159.
- 10- Donald CD, Potter WZ, Jollow David, Mitchell JR. Species differences in hepatic glutathione depletion covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sci* 1974; 14:299-2109.
- 11- Lee SC, Tsai CC, Chen JC, Lin JG, Lin CC, Hu ML, Lu S. Effects of “Chinese yam” on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2002; 23(6):503-8.
- 12- Uličná O, Greksák M, Vančová O, Zlatoš L, Galbavý Š, Božek P et al. Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Physiol Re* 2003; 52:461-6.
- 13- Luper SND. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. *Altern Med Rev* 1998; 3(6):410-21.
- 14- Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers* 2003; 147(2):137-45.
- 15 - Mézáros A, Bellon A, Pinté E, Horváth G. Micropropagation of lemon balm *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1999; 57: 149–152.
- 16- Lorenzi H, Mato FJA *Plantas medicinais no Brasil: nativas ou exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512 p.
- 17- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 96:145–150.

- 18- Salah SM, Jager AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 145-149.
- 19- Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003; 62:121-25.
- 20- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Plantas medicinales: guía para los profesionales de la salud*. Barcelona 1^a ed. 2005: Pharma editors, 568. p
- 21- Ribeiro MA, Bernado-Gil MG, Esquível MM. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical fluid*, 2001; 21: 51-60.
- 22- Herodež ŠS, Hadolin M, Škerget M, Željko K. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry* 2003; 80:275-82.
- 23- Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea. *Pharm Acta Helv* 1998; 72: 301-5.
- 24- Sousa AC, Aliviano DS, Blank AF, Alves PB, Aliviano CS, Gattass CR. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56(5):677-81.
- 25- Betterweck V, Derendorf H, Gaus W. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Are Preventive Screenings Necessary and Appropriate? *Planta Med* 2004; 70:784-791.
- 26- Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interac* 2002; 139:1-21.
- 27- Alves JCFF, Santos RCV, Castaman TA, Oliveira JR. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res* 2004; 49:245-48.

- 28- Arnaldos TL, Munoz R, Ferrer MA, Calderón AA. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum* 2001; 113:315-22.
- 29- Mattos, L.M. Métodos de análise de flavonóides e atividade antioxidante da própolis. Belo Horizonte, 2000. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 30- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957; 28:56.
- 31- Raghavendran HRB, Sathivel A, Devaki T. Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen induced hepatic oxidative stress. *Journal of Health Science* 200450(1):42-6.
- 32- Cuppett SL, Hall III CA. Antioxidant activity of the Labiatae. *Adv food nutr res* 1998; 42:245-71.
- 33- Ye YN, Liu ESL, Li Y, So HL, Cho CCM, Sheng HP et al. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. *Life Sci* 2001; 69:637-46.
- 34- Venkataramanan R, Ramachandran V, Komoroski BJ, Zhang S, Schiff PL, Strom SC. Short Communication. Milk Thistle, a Herbal Supplement, Decreases the Activity of CYP3A4 and Uridine Diphosphoglucuronosyl Transferase in Human Hepatocyte Cultures. *Drug metab dispos* 2000; 28(11):1270-73.

7. FIGURES

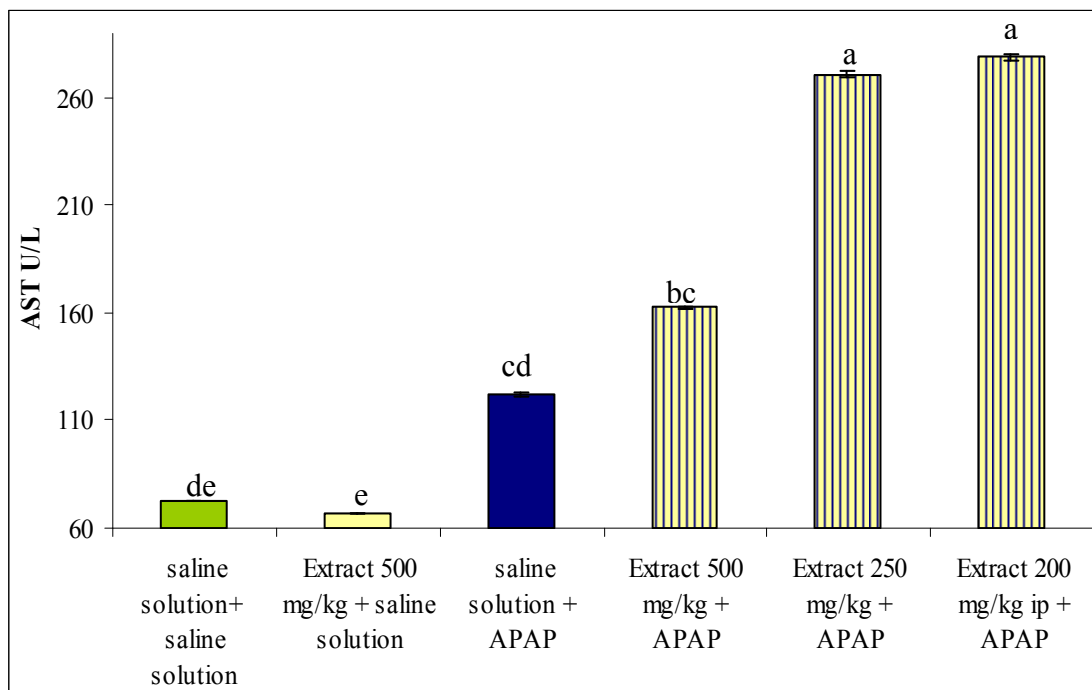


Figure 1: Activity of aspartate aminotransferase (AST) in the serum of rats treated with intragastric extracts of *M. officinalis* and intraperitoneal acetaminophen (APAP). The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 5$. Bar represents standard error.

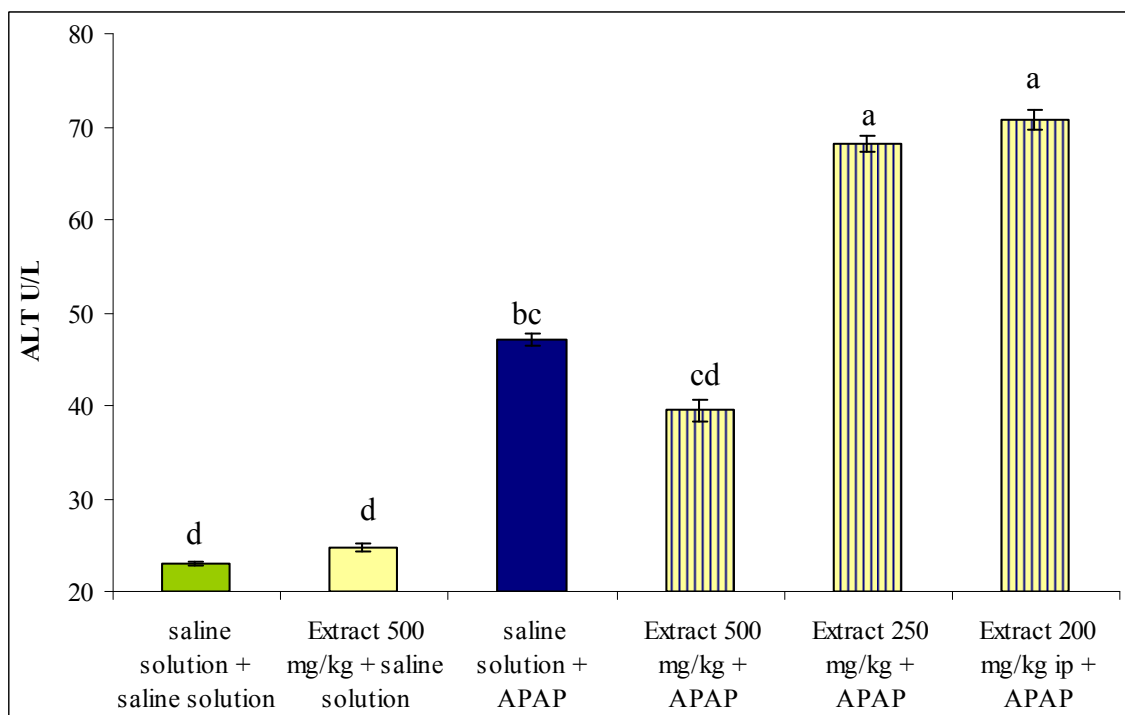


Figure 2: Activity of alanine aminotransferase (ALT) in the serum of rats treated with extracts of *M. officinalis* and acetaminophen (APAP). The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 5$. Bar represents standard error.



Figure 3: Histological slices of animals treated with saline solution (saline ig + saline ip group) and animals treated with APAP (saline ig + APAP ip group). A) Group extract 500 mg/kg + saline solution; B) Group saline solution + APAP; C) Group saline solution + e saline solution; D) Group extract 500 mg/kg + APAP; E) Group extract 250 mg/kg + APAP; F) Group extract 200 mg/kg ip + APAP. (100 x).

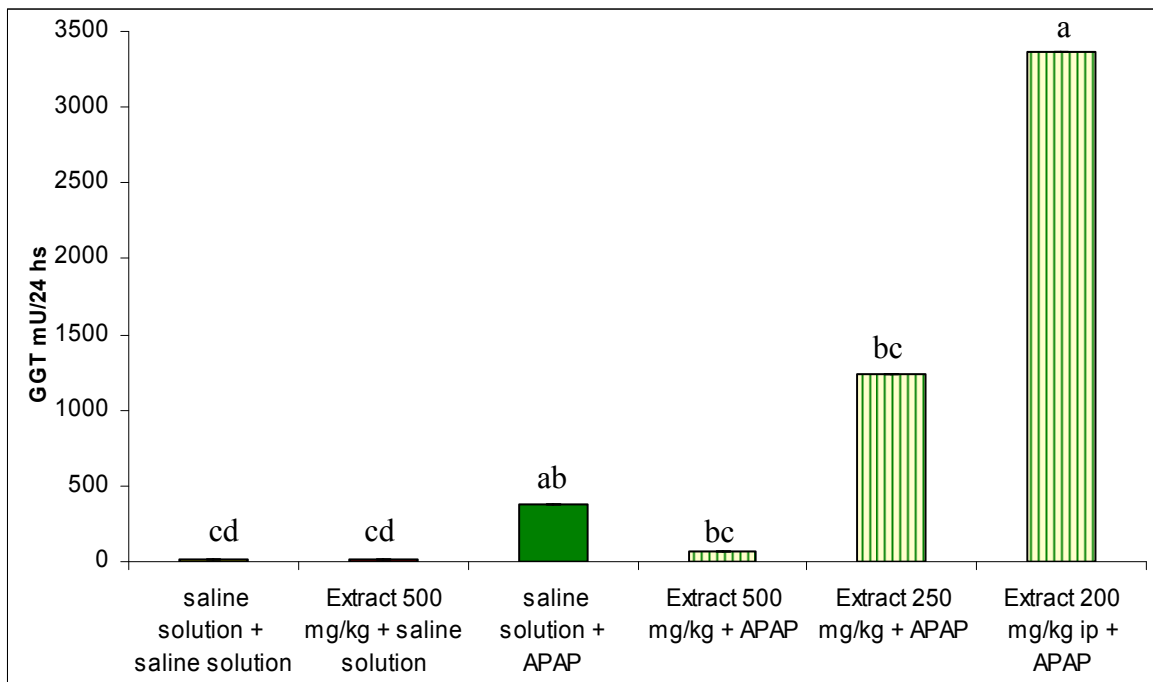


Figure 4: Concentration of γ -glutamyltransferase (GGT) in the urine of rats after treatment. acetaminophen (APAP). The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 5$. Bar represents standard error.

Artigo II**Anti-inflammatory effect of *Melissa Officinalis* L. in pleurisy induced by carrageenan in Wistar rats.**

Denise Pereira Müzell, Carlos Eduardo Leite,
Jarbas Rodrigues de Oliveira, Leandro Vieira Astarita

Laboratório de Pesquisa em Biofísica e Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga 6681 prédio 12C salas 263 e 253 – Porto Alegre/RS – Brasil.

Abstract

Melissa officinalis L. (Lemon balm) presents approximately 0.5% of phenolic compounds such as quercetin flavonoids and rosmarinic acid. These compounds display anti-inflammatory actions, of which the flavonoids have a series of biological effects such as the capacity to inhibit cyclooxygenase. The aim this study was to analyse the bioactive properties of extracts of *M. officinalis* in anti-inflammatory actions in pleurisy induced by carrageenan. Female Wistar rats were used as an experimental model in order to assess the anti-inflammatory effect of aqueous extracts of Lemon balm. The animals were divided into five groups: control group, carrageenan group, 200 mg/kg of extract group, 100 mg/kg of extract group and 50 mg/kg of extract group. The animals were pre-treated intraperitoneally with 2 mL/kg of saline solution or extracts, 30 minutes prior to having pleurisy induced by carrageenan. The volumes of exudate were analysed, together with the inflammatory markers, levels of leukocyte, polymorphonuclear cells and total protein levels. The extracts of *M. officinalis* showed high levels of phenolic compounds and quercetin flavonoids. In the carrageenan group, there was an increase in both the exudate and inflammatory markers: leukocyte migration, polymorphonuclear cells and concentration of total proteins. The groups of animals pre-treated with 200 and 100 mg/kg of extract and carrageenan displayed an anti-inflammatory action, reducing the levels of exudate, as well as those of leukocytes and polymorphonuclear cells. While the extract at a concentration of 200 mg/kg provoked a reduction in the total proteins in the pleural exudate, the extract at a concentration 50 mg/kg displayed no anti-inflammatory effect. The results point to a dose dependent response.

Key Words: phenolic compounds, flavonoids, acute inflammation, anti-inflammatory action, leukocyte, polymorphonuclear.

1. INTRODUCTION

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) has glandular trichomes with essential oils and phenolic compounds that are responsible for the characteristic aroma of the species in this family (1, 2).

The high levels of phenolic compounds, like the quercetin flavonoids and the rosmarinic acid (3) represent the fraction with the greatest biological activity in this species (4). These groups of compounds have anti-oxidant (5, 6) and anti-spasmodic properties, induce sleep (7) and anti-tumoural activity (8), as well as being used in the treatment of herpes (6, 9). These compounds have recognised anti-inflammatory action, in which flavonoids have the capacity of inhibiting several enzymes involved in the inflammatory process, such as monooxygenase, lipoxygenase and cyclooxygenase (10).

A number of studies have pointed to the anti-inflammatory activities of vegetable extracts, such as *Loasa speciosa*, which reduces oedema (11), *Camellia sinensis* (green tea) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary), with anti-inflammatory action (12, 13).

Rotelli et al (14) demonstrate that quercetin bruising/edema reduces oedema induced by carrageenan, while extracts of *Wilbrandia ebracteata* (Curcubitaceae), exhibit anti-inflammatory action, inhibiting the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) (15).

Pleurisy is a model of acute inflammation induced by carrageenan, used in the evaluation of the efficacy of non-steroid anti-inflammatory drugs, and is considered the best experimental model for the induction of acute inflammation (16, 17). Administration of carrageenan induces pleural oedema, provoking the release of histamine, bradykinin and 5-hydroxytryptamine (5-HT), which is later followed by the release of prostaglandin and of pro-inflammatory cytokines (18). Following the induction of pleurisy, there is an increase in the volume of exudate and the levels of total inflammatory cells, such as polymorphonuclear (PMNs) and mononuclear (MN) cells (16, 17). The present study had the objective of analyzing the anti-inflammatory activity of extracts of *Melissa officinalis* in pleurisy induced by carrageenan.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Source plants of *Melissa officinalis* (Lamiaceae) were cultivated in a nursery with regular watering, and later taken to the laboratory fifteen days prior the start of the experiments. The plants were kept at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a 16 hour photoperiod and regular watering.

Fifty grams (50g) of leaves were collected and mashed with distilled water (1:5 w/v). After, the mash was filtered in paper with the aid of a vacuum pump. The extract was then centrifuged at 15°C for 15 minutes at 1,000 xg. The supernatant was then stored at -20°C until its use.

2.2. Animals

In order to analyse the anti-inflammatory effect of *M. officinalis*, female Wistar rats were used, weighing between 180 - 220 g, supplied by the university animal house.

Animals were housed on a 12h light:dark cycle in a temperature-controlled room with free access to water and food. The animals were cared for and used in accordance with the “Guiding Principles in the Care and Use of Animals” approved by the Council of the American Physiological Society (19).

2.3. Quantification of the phenolic compounds and quercetin flavonoids in the extracts

Phenolic compound levels were assessed by means of the colorimetric technique using Folin-Ciocalteu (ImprintSul Ltda.) reagents and 20% Na_2CO_3 , in a spectrophotometer. Absorbancy (765nm) was determined after 30 minutes incubation at 25°C in the dark (20). Gallic acid was used as standard in order to establish the calibration curve.

Quercetin flavonoids levels were determined by means of the colorimetric technique, using the reaction with 96% alcohol, 10% aluminium nitrate and potassium acetate 1M. Absorbancy (415 nm) was determined in a spectrophotometer after 5 minutes (21). Quercetin was used as standard in order to establish the calibration curve.

2.4. Induction of pleurisy

Rats were anesthetized with 2 mL/kg of Vertanacol[®] (ketamine) and Anasedan[®] (xylazine) (3:1) and treated with 0.2 mL of 1% carrageenan, suspended in distilled water. Carrageenan was injected into the right pleural cavity (control carrageenin group).

The animals were pre-treated intraperitoneally (ip) with 2 mL/kg of saline solution (control group) or with extracts of *M. officinalis* at concentrations of 200 mg/kg, 100 mg/kg and 50 mg/kg (pre-treated groups), 30 minutes prior to having pleurisy induced by carrageenan. The animals were divided into five groups: A) control group, B) carrageenan control group, C) 200 mg/kg of extract group, D) 100 mg/kg of extract group and E) 50 mg/kg of extract group.

2.5. Exudate analysis

Four hours after injection of carrageenan, the animals were sacrificed in an atmosphere of CO₂. Pleural exudates from each animal was harvested by washing the pleural cavity with 2 mL of sterile saline containing (NaCl 0.9%) with 1% EDTA. Any exudates with blood contamination was rejected. The exudates volumes were measured and results were expressed by subtracting the volume (2 mL of saline solution) injected in the pleural cavity from total volume recovered (19, 22).

The total cell count in the pleural cavity was determined using a Neubauer chamber after diluting the pleural fluid with Thoma solution (1:20). Exudate smears were stained with May-Grünwald/Giemsa for differential cell count, which was performed with an optic microscope under immersion objective (15, 23). The protein concentration was determined by in exudate. The pleural exudate recovered from the pleural cavity was centrifuged (3,000 xg) for 15 minutes and the total protein content of the supernatant quantified spectrophotometrically using the Biuret technique (19).

2.6. Statistical analysis

The results presented herein were obtained through the mean and the standard error. In order to analyse the differences between the volume of exudate, the levels of polymorphonuclear cells, leukocytes and of proteins in the pleural exudate in the different

groups, one-way variance analysis (ANOVA) and the Tukey-Kramer *post-hoc* test were used, with a significance level of $P \leq 0.05$.

The homogeneity of the groups was verified by applying the Levene test, with $P \geq 0.05$. In order to perform these tests, version 11.5 SPSS software was used.

3. RESULTS

The aqueous extracts of *M. officinalis* presented high levels of phenolic compounds (pc) and quercetin flavonoids (qf). In the 100 mg of leaves of *M. officinalis* there is 0.35 mg of pc (0.35 %) and 0.144 mg of qf (0.14 %).

The animals treated with 1% carrageenan (Figures 1 – 4) showed an increase in both the volume of exudate (0.85 ml/cavity) and leukocyte migration (46.18×10^6 /cavity), as well as polymorphonuclear cells (42.46×10^6 /cavity) and protein concentration in the exudate (1.55 g/dL), when compared with the control group (respectively, 0.07 ml/cavity, 10.57×10^6 /cavity, 3.12×10^6 /cavity and 0.17 g/dL).

The groups of animals pre-treated with 200 and 100 mg/kg of extract and carrageenan showed a reduction in the levels of exudate (0.34 and 0.55 ml/cavity, respectively) (Figure 1), in the levels of leukocytes (22.14 and 30.56×10^6 /cavity, respectively) (Figure 2), and polymorphonuclear cells (18.57 and 26.23×10^6 /cavity) (Figure 3), when compared with the carrageenan group. However, the groups of animals pre-treated with 50 mg/kg of extract displayed no effect on these parameters. The extract at a concentration of 200 mg/kg provoked a reduction in total proteins (1.34 g/dL) in the pleural exudate (Figure 4) the extract at a concentration of 100 mg/kg and 50 mg/kg displayed no effect on the total protein in the pleural exudate, when compared with the carrageenan group.

4. DISCUSSION

Inflammation is a protective process that is essential for the preservation of the integrity of the organism in the event of chemical, physical and infectious damage. Often, the inflammatory response to severe lesions, erroneously damages normal tissue (24).

Acute inflammation is characterized by the classical signs of pain, heat, redness and swelling, involving a complex series of events including vasodilatation, increased permeability, fluid exudation and the migration of leucocytes to the side of inflammation (25).

The recruitment of neutrophils is dependent on the generation of chemotaxic factors and the expression of adhesion molecules (26). During an inflammatory response, leukocytes traverse the endothelial barrier into the tissue space. Normally, the endothelium is not adhesive and impermeable to the leukocytes, but under inflammatory conditions, intracellular signals are generated enhancing adhesiveness and leading endothelial permeability (27). Several neutrophil chemoattractant factors are described in the literature, such tumor necroses factor- α (TNF- α) and platelet-activating factors (PAF) (28). Acute inflammation is determined by the concentration of leukocytes exuded (29), mainly PMNs.

Extracts of *M. officinalis* at concentrations of 200 and 100 mg/kg provoked a reduction in the volume of the pleural exudate, and in the levels of both leukocytes and polymorphonuclear cells. However, the reduction in total proteins occurred only in the animals in the group pre-treated with concentration of the extract at 200 mg/kg. These results indicate an anti-inflammatory response. At the same time, the extract at a concentration of 50 mg/kg displayed no anti-inflammatory effect.

Derek (17) reported that cyclooxygenase-2 (COX-2) may display a pro-inflammatory activity in the first phase of pleurisy induced by carrageenan, in which polymorphonuclear cells predominate, and is followed, by a phase during which there is anti-inflammatory activity, when mononuclear cells predominate.

Williams (30) showed that extracts of *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) can inhibit cyclooxygenase and 5-lipoxygenase through tanetin, a lipophilic flavonol. This flavonol inhibited the eicosanoids, a derivative of arachidonic acid, suggesting an anti-inflammatory action. The same occurs with other flavonoids that can inhibit cyclooxygenase, monooxygenase and lipoxygenase through the metabolism of arachidonic acid (10,14). Extracts of *Mikania laevigata* (Asteraceae) and *Mikania involucrate*, provoke a reduction in leukocyte migration and polymorphonuclear cells in pleurisy induced by carrageenan (31). Similarly, extracts of *Loasa speciosa* (Loasaceae) displayed anti-inflammatory action in rats, reducing the oedema in doses of 500, 250 and

125 mg/kg. Moreover, concentrations of 500 and 250 mg/kg significantly reduced the volume of the pleural exudate and the levels of leukocytes and polymorphonuclear cells (11).

Extracts of *Camelia sinensis* provoked a reduction in oedema caused by carrageenan in mice, diminishing the levels of polymorphonuclear cells (12). Janicsák et al. (32) report that rosmarinic acid, found in all the members of the Lamiaceae family, displays anti-inflammatory action, inhibiting monooxygenase, lipoxygenase and cyclooxygenase (6).

The extracts of *M. officinalis* have phenolic compounds, such as quercetin and rosmarinic acid (3), with recognised anti-inflammatory properties and anti-oxidant action (5, 6, 10). Given this, the reduction in the volume levels of the pleural exudate, as well as the levels of leukocytes, polymorphonuclear cells and total proteins may be due to the phenolic constituents of the extract. The results also suggest that there is a dose-response effect in relation to the concentrations of extracts and the inflammation markers evaluated.

Further studies should be carried out with the aim of analysing the effect of diary use of extracts *M. officinalis* in order to reduce the inflammation process induced by carrageenan.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Dra. Clarisse Machado.

6. REFERENCES

- 1- Evans, WC. Trease and Evans: Pharmacognosy, 15th ed. London: W.B. Saunders 2002. 585 p.
- 2- Judd WS. Plant systematics: a phylogenetic approach. 2. ed. Sunderland: Editora Sinauer Associates 1999. 464 p.: il.
- 3- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Plantas medicinales: guía para los profesionales de la salud. Barcelona 1^a ed. 2005: Pharma editors, 568. p
- 4- Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003; 62:121-25.
- 5- Herodež ŠS, Hadolin M, Škerget M, Željko K. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry* 2003;80:275-82.
- 6- Ribeiro MA, Bernado-Gil MG, Esquivel MM. *Melissa officinalis*, L.: Study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical fluids* 2001; 21: 51-60.
- 7- Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea. *Pharm Acta Helv* 1998; 72: 301-5.
- 8- Sousa AC, Aliviano DS, Blank AF, Alves PB, Aliviano CS, Gattass CR. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56(5):677-81.
- 9- Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Brum LFS, Picada JN, Ardenghi. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res*, 2005; 52:199-203.
- 10- Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers* 2003; 147(2):137-45.

- 11- Badilla B, Arias AY, Arias M, Mora GA, Poveda LJ. Anti-inflammatory activities of *Loasa speciosa* in rats and mice. *Fitoterapia* 2003; 74:45-51.
- 12- Paola PD, Mazzon E, Muià C, Genovese T, Menegazzi M, Zaffini R, Suzuki H, Cuzzocrea S. Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. *Respir Res* 2005; 29;6(1):66.
- 13- Cuppett SL, Hall III CA. Antioxidant activity of the Labiatae. *Adv food nutr res* 1998; 42:245-71.
- 14- Rotelli AE, Guardiã T, Juárez AO, Rocha1 NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res* 2003; 48: 601–606.
- 15- Pertes RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, Brum-Fernandes AJ, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sci* 1999; 64(26):2429-37.
- 16- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR, Gilroy D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 1131–1135.
- 17- Derek W, Gilroy, PR, Colville-Nash D, Willis J, Chivers MJ, Paul-Clark, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; 5:(6).
- 18- Corsini E, Paola RD, Viviani B, Genovese T, Mazzon E, Lucchi L, Marinovich M, Galli CL, Cuzzocrea S. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rat. *Immunology* 2005; 115:253-261.
- 19- Alves JCFF, Santos RCV, Castaman TA, Oliveira JR. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res* 2004; 49:245-48.

- 20- Arnaldos TL, Munoz R, Ferrer MA, Calderón AA. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum* 2001; 113:315-22.
- 21- Mattos, LM. Métodos de análise de flavonóides e atividade antioxidante da própolis. Belo Horizonte, 2000. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
- 22- Cuzzocrea S, Costantino G, Zingarelli B, Mazzon E, Micali A, Caputi AP. The protective role of endogenous glutathione in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Eur Jf Pharmacol* 1999;372:187–197.
- 23- Ialenti A, Ianaro A, Maffia P, Sautebin L, Di Rosa M. Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carragenin-induced rat pleurisy. *Inflamm Res* 2000;49:411-417.
- 24- Habashy RR, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, Al-Azizi M. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. *Pharmacol Res* 2005;51:95-105.
- 25- Gualillo O, Eiras S, Lago F, Diéguez C, Casanueva FF. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci* 2000;67:2433-2441.
- 26- Arruda VA, Guimarães AQ, Hyslop S, Araújo MF, Bon C, Araújo AL. Bothrops lanceolatus (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon* 2003;41:99-107.
- 27- Bombini G, Canetti C, Rocha FAC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *European Journal of Pharmacology* 2004;496:197-204.

- 28- Secco DD, Paron JA, Oliveira SHP, Ferreira SH, Silva JS, Cunha FQ. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* 2004;9:153-164.
- 29- Ramos AT, Gonçalves LRC, Ribeiro OG, Campos ACR, Sant'Anna OA. Effects of *Lonomia oblique* (lepidoptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. *Toxicon* 2004;43:761-768.
- 30- Williams CA, Houlst JRS, Harborne JB, Greenham J, Eagles J. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* 1995; 38: (1) 267- 270.
- 31- Suyenaga ES, Reche E, Farias F M, Schapoval E E S, . Chaves C G M, Henriques AT. Antiinflammatory Investigation of Some Species of *Mikania*, *Phytother Res* 2002; 16:519–523.
- 32- Janicsák G, Máthé I, Miklóssy-Vári V, Blunden G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology* 1999; 27: 733-738.

7. FIGURES

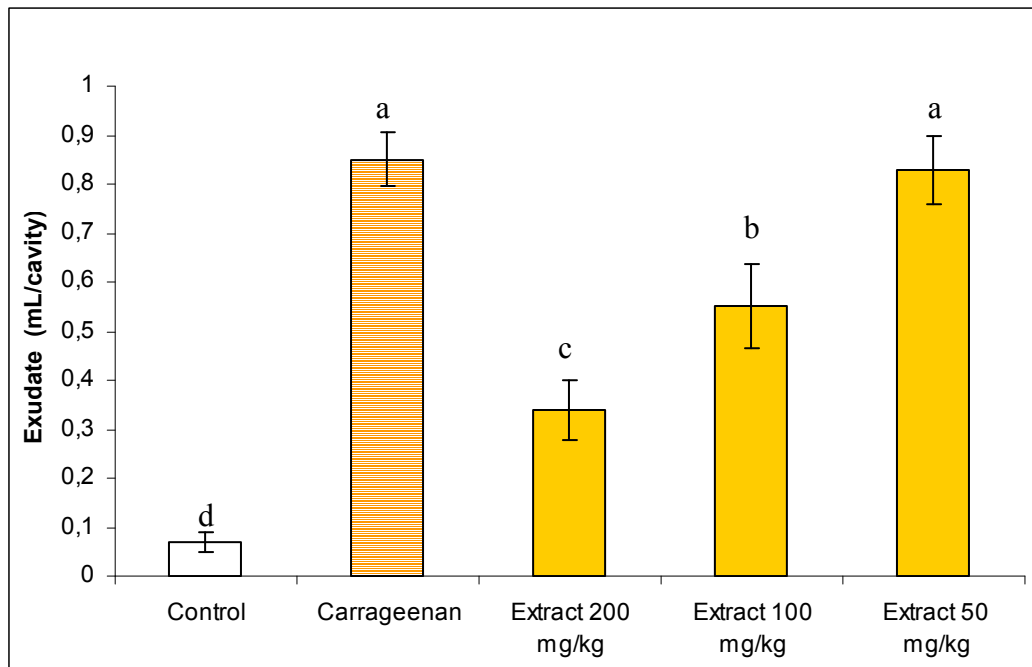


Figure 1: Preventative effects of extracts of *M. officinalis* (2 mL/kg) on the pleural exudate evaluated after the administration of 1% carrageenan 0.2 mL. The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 6$. Bar represent the standard error.

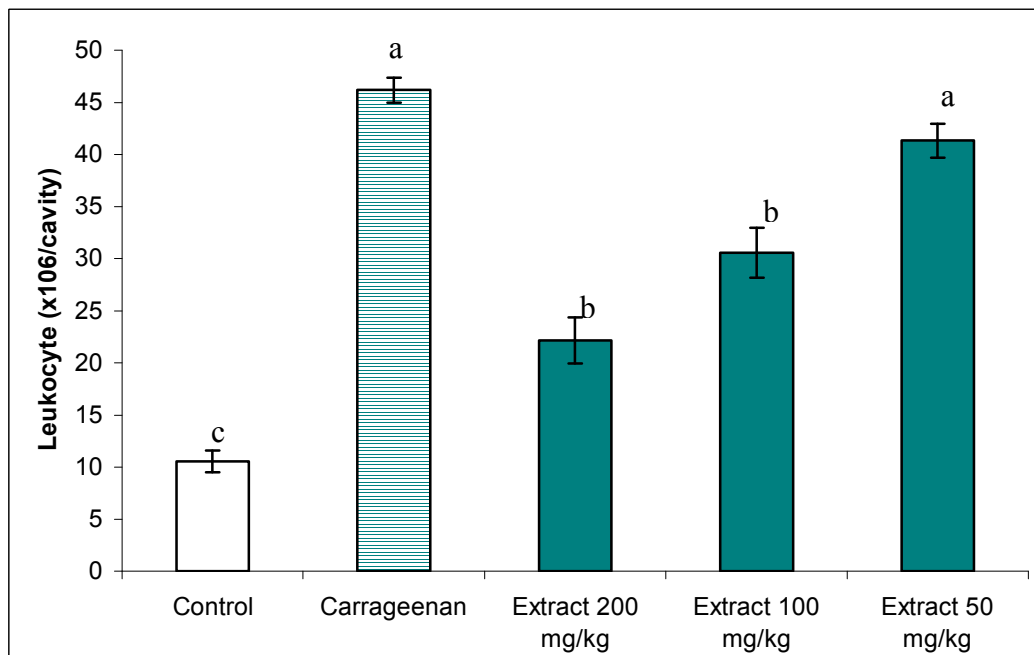


Figure 2: Preventative effects of extracts of *M. officinalis* (2 mL/kg) on the presence of leukocytes in the pleural exudate evaluated after the administration of 1 % carrageenan 0.2 mL. The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 6$. Bar represent the standard error.

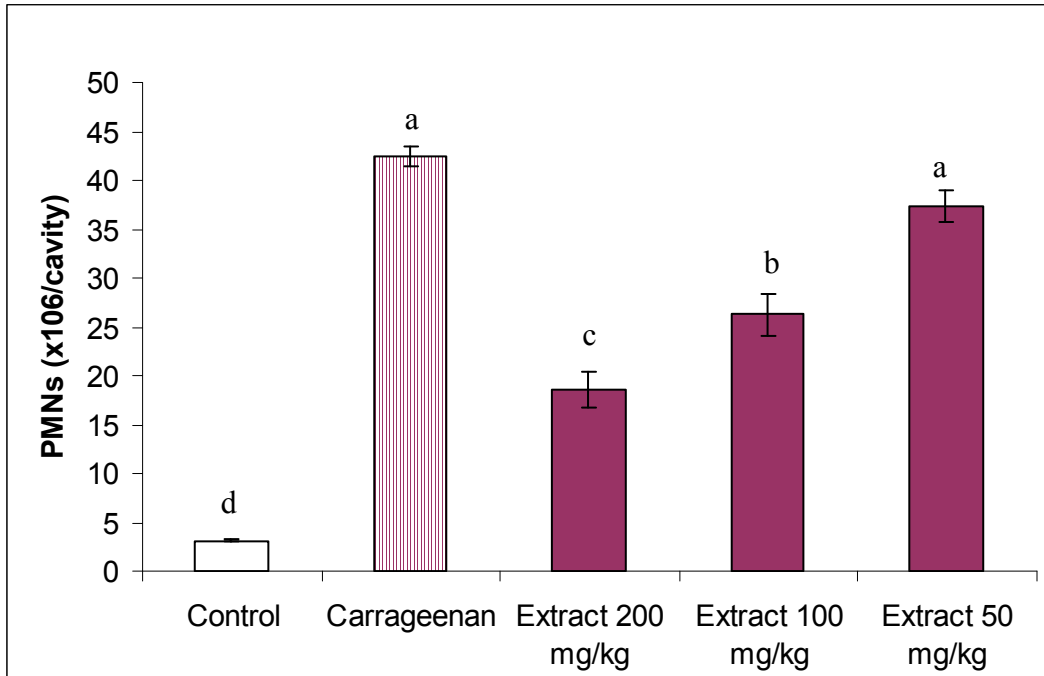


Figure 3 – Preventative effects of extracts of *M. officinalis* (2 mL/kg) on the increase in the presence of polymorphonuclear cells in the pleural exudate evaluated after the administration of 1 % carrageenan 0.2 mL. The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 6$. Bar represent the standard error.

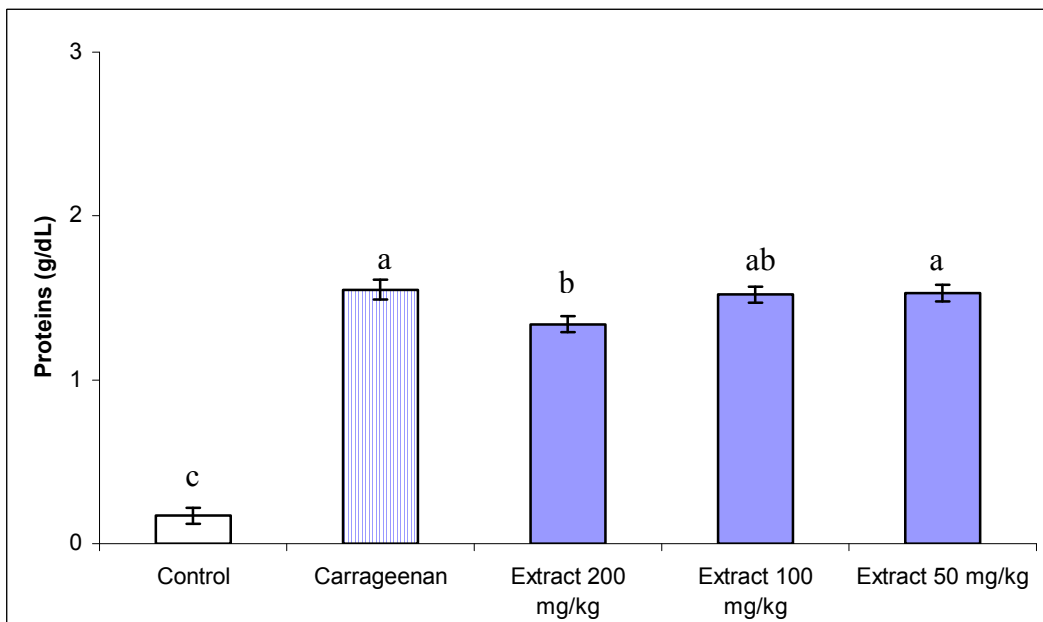


Figure 4 - Preventative effects of extracts of *M. officinalis* (2 mL/kg) on the increase in protein concentration in the pleural exudate evaluated after the administration of 1 % carrageenan 0.2 mL. The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$), $n = 6$. Bar represent the standard error.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visou analisar os principais efeitos das propriedades bioativas dos extratos de *Melissa officinalis*, tanto na toxicidade induzida por acetaminofen (APAP), quanto na ação antiinflamatória na pleurisia induzida por carragenina em ratos Wistar.

Os compostos fenólicos como os flavonóides quercetínicos e o ácido rosmarínico, presentes em extratos de *Melissa officinalis* apresentam reconhecida atividade biológica como a ação antitumoral, hepatoprotetora e antiinflamatória.

Neste estudo, constatou-se a ação antiinflamatória de extratos de *M. officinalis* pela redução dos níveis de marcadores inflamatórios. Os elevados níveis de compostos fenólicos como o ácido rosmarínico e os flavonóides quercetínicos presentes nesta espécie podem ter agido inibindo as ciclooxigenases e lipooxigenases.

Os extratos não apresentaram nem ação hepatotóxica e nem ação nefrotóxica. Contudo, quando 250mg/kg do extrato foi administrado via intragástrica ou 200 mg/kg via intraperitoneal, e posteriormente administrado APAP apresentaram um efeito potencializador na hepatotoxicidade induzida por APAP.

Os extratos administrados via intragástrica não protegeram contra a nefrotoxicidade induzida por APAP. Enquanto, a administração via intraperitoneal sugere um efeito potencializador do extrato na toxicidade induzida por APAP.

Provavelmente, este aumento nos níveis dos marcadores de lesão hepática e de lesão renal ocorreu pela redução tanto do metabolismo do APAP via glicuronidação e sulfatação, quanto pela redução nos níveis de glutathiona (GSH), promovendo um aumento da atividade do citocromo P450 quando se esta em jejum. Podendo também estar relacionado com o metabolismo de compostos fenólicos e açúcares presentes no extrato, resultando no aumento da produção de NAPQI, um radical livre.

Os resultados também sugerem que as concentrações dos extratos administradas não foram suficientes para promoverem a ação antioxidante, seqüestrando (*scavenging*) radicais livres produzidos pela metabolização do APAP.

Estes órgãos apresentam diversas isoformas do citocromo P450 envolvidas tanto no metabolismo do APAP, quanto no metabolismo dos compostos fenólicos presentes nos extratos de *M. officinalis*, influenciando na farmacocinética do APAP. Para constatar este efeito, são necessários estudos visando elucidar os mecanismos envolvidos na bioativação

do APAP, buscando relacionar o metabolismo do APAP e de extratos aquosos de *M. officinalis* em animais alimentados e animais com restrição alimentar.

CONCLUSÃO

- No presente estudo observou-se que os extratos aquosos de *Melissa officinalis* não protegeram o fígado e o rim contra a toxicidade induzida por APAP.
- Neste estudo também se observou que os extratos de *Melissa officinalis* apresentaram uma ação antiinflamatória, reduzindo os níveis dos marcadores de inflamação pela presença dos compostos fenólicos nestes extratos.
- O grupo pré-tratado com 500 mg/kg extrato de *M. officinalis* via intragástrica e tratado com solução salina via intraperitoneal não apresentou, nem toxicidade hepática e nem toxicidade renal.
- O grupo pré-tratado com 500 mg/kg de extrato via intragástrica e tratado com acetaminofen (APAP) via intraperitoneal, não protegeu o fígado contra a toxicidade induzida por APAP, quando comparado com o grupo pré-tratado com solução salina via intragástrica e tratada com APAP via intraperitoneal.
- Tanto o grupo pré-tratado com 250 mg/kg de extrato via intragástrica e tratado com APAP via intraperitoneal, quanto o grupo pré-tratado com 200 mg/kg extrato via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração do APAP via intraperitoneal apresentaram um aumento na hepatotoxicidade induzida por APAP, quando comparado com o grupo pré-tratado com solução salina via intragástrica e tratado com APAP via intraperitoneal.
- O aumento dos níveis dos marcadores bioquímicos de lesão hepática no soro não foi acompanhado da presença de necrose no parênquima hepático na região centrolobular nas análises histológicas.

- O grupo pré-tratado com 200 mg/kg de extrato via intraperitoneal, 30 minutos antes do tratamento com APAP via intraperitoneal apresentou um aumento na nefrotoxicidade induzida por APAP. Enquanto, grupos pré-tratados com extratos via intragástrica e tratados com APAP via intraperitoneal não apresentaram proteção contra a toxicidade induzida por APAP, quando comparado com o grupo pré-tratado com solução salina via intragástrica e tratado com APAP via intraperitoneal.
- Os grupos tratados com extratos de *M. officinalis* nas doses 200 e 100 mg/kg apresentaram efeito antiinflamatório na pleurisia induzida por carragenina. Contudo, o grupo tratado com extrato na dose 50 mg/kg não apresentou efeito antiinflamatório.
- A administração dos extratos *M. officinalis* nas doses 200 mg/kg, 100 mg/kg e 50 mg/kg apresentaram uma dose-resposta dependente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a necessidade de futuras investigações da ação antiinflamatória dos extratos aquosos de *M. officinalis*, tanto em machos e fêmeas Wistar, quanto em adultos jovens e idosos, utilizando concentrações e frações, observando as influências hormonais e imunológicas relacionadas ao gênero e a idade. Também deveria ser analisado de que forma o extrato de *M. officinalis* é absorvido pela via gástrica e metabolizado no fígado e no rim, visando elucidar os mecanismos envolvidos na ação das moléculas bioativas presentes nestes extratos.