

**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA E TOXICOLOGIA APLICADA**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO  
ETANÓLICO DAS FLORES DE *Hibiscus tiliaceus* L.**

Tese para obtenção do Título de Doutor em  
Genética e Toxicologia Aplicada.

**Elemar Gomes Maganha**

**Orientadora: Dra. Jenifer Saffi**

**CANOAS**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), e no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), recebendo apoio financeiro da ULBRA, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Aos meus pais, Edeimar e Dinora pelo apoio necessário, por serem as pessoas mais maravilhosas do mundo. Obrigado pelo exemplo de vida, de fé, perseverança, e fundamentalmente de amor (amo vocês).

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Prof. Dr.<sup>a</sup> Jenifer Saffi pelas orientações, contribuições, sugestões, disponibilidade e por todas as experiências vividas durante este período de trabalho, e, principalmente, pela amizade em mais uma etapa de minha vida.

Aos professores Dr. Marc F. Richter, Dr.<sup>a</sup> Maria I. Melicchi, Dr. Renato Moreira Rosa que contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) pelo apoio financeiro na pesquisa e à Universidade de Erechim (URI) pela disponibilidade dos laboratórios.

A TODOS os colegas de mestrado e doutorado pelo convívio e companheirismo, em especial, Giovanni Cignachi e Valéria Flores Peres pela amizade, auxílio técnico, disponibilidade e colaboração.

A Roberta, Pâmela e Virginia pela amizade e colaboração na realização desta pesquisa.

A toda minha família, meus pais, Edemar e Dinora, pela dedicação, preocupação, carinho, apoio e estímulo.

Ao meu amor, Edna, pelo carinho, compreensão, paciência durante este período e principalmente pelo incentivo na realização deste doutorado.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, colaboraram nesta etapa de crescimento profissional e pessoal.

E, especialmente, a Deus por ter me iluminado para finalizar este trabalho.

## ÍNDICE GERAL

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1. A PLANTA <i>Hibiscus tiliaceus</i> L.</b> .....	13
1.1 Generalidades.....	13
1.2 Composição Química .....	15
1.3 Uso na medicina tradicional.....	18
<b>2. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS</b> .....	18
2.1 Extração por ultra-som.....	19
<b>3. ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES</b> ....	21
3.1 Antioxidantes enzimáticos.....	23
3.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	24
3.2.1 Flavonóides.....	25
<b>4. MUTAGÊNESE E ANTIMUTAGÊNESE</b> .....	30
<b>5. A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDO</b> ....	32
5.1 Defesas antioxidantes da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
5.2 O estudo de substâncias com atividades pró-e/ou antioxidante – modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	35
5.3 Teste de mutação <i>forward</i> .....	39
<b>6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	40

<b>II – OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
1. Objetivo geral.....	42
2. Objetivos específicos.....	42
<b>III – CAPÍTULO I.....</b>	<b>43</b>
Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus <i>Hibiscus</i> .....	43
<b>IV-CAPÍTULO II.....</b>	<b>82</b>
Evaluation of the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> biological activity of the ethanol extract of flowers of <i>Hibiscus tiliaceus</i> L.....	82
<b>V-DISSCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>114</b>
<b>VI – CONCLUSÕES.....</b>	<b>120</b>
1. Conclusão Geral.....	120
2. Conclusões Específicas.....	120
<b>VII – PERSPECTIVAS.....</b>	<b>122</b>
<b>VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>123</b>
<b>IX-ANEXOS.....</b>	<b>144</b>
Anexo 1-Avaliação da atividade antimicrobiana pelos métodos difusão em placa e concentração inibitória mínima (CIM).....	144

## LISTA DE FIGURAS

## I – INTRODUÇÃO

<b>Figura 1.</b> Flor do <i>Hibiscus tiliaceus</i> L.....	14
<b>Figura 2.</b> Partes aéreas do <i>Hibiscus tiliaceus</i> L.....	15
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas de alguns componentes isolados de <i>Hibiscus tiliaceus</i> L. na madeira, raízes, flores e frutos (Gros <i>et al.</i> , 1985).....	16
<b>Figura 4.</b> Estrutura de fitoesteróides identificados do <i>Hibiscus tiliaceus</i> L (Rosa <i>et al.</i> , 2006).....	17
<b>Figura 5.</b> Esquema da Extração por Ultra-som (MELECCHI, 2005).....	21
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do balanço entre estresse oxidativo e os antioxidantes <i>in vivo</i> (Adaptado de HALLIWEL, 2008).....	22
<b>Figura 7.</b> Estrutura química dos flavonóides e seus subgrupos mais importantes.....	27
<b>Figura 8.</b> Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (Adaptado de FUGE & WERNER, 1997).....	33
<b>Figura 9.</b> Estrutura do radical livre DPPH.....	37
<b>Figura 10.</b> Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes <i>in vitro</i> utilizando o sistema da xantina oxidase (OWEN <i>et al.</i> , 1996).....	38
<b>Figura 11.</b> Derivatização dos radicais hidroxila com o ácido salicílico, levando a formação de dois compostos estáveis 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5 DHBA).....	39
<b>Figura 12.</b> Estrutura química dos análogos arginina e canavanina.....	49

## III – CAPÍTULO I

<b>Figure 1.</b> Some biological compounds of <i>H. syriacus</i> : (1) scopoletin; (2) clemiscosin A; (3) clemiscosin C; (4) clemiscosin D; (5) structure of pentacyclic triterpenes; (6) syriacusin A.....	76
<b>Figure 2.</b> The metabolite 9,9'-O-feruloyl(-)secoisolariciresinol, an cytotoxic compound from <i>H. taiwanensis</i> .....	77
<b>Figure 3.</b> Structure of delphinidin-3-glucoxyloside (1), the major anthocyanin from <i>H. sabdariffa</i> flowers, and protocatechuic acid (PCA).....	78



## IV-CAPÍTULO II

**Figure 1.** Survival Assay with cells of *S. cerevisiae* in stationary phase after treatment with ethanolic extract of *Hibiscus tiliaceus* L flowers against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. The results represent the average of the experiments carried out in triplicate. Data significant in relation to only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells group at P<0.05; \*\* P<0.01/ One-way ANOVA Survival (%) Tukey's Multiple Comparison Test.....112

**Figure 2.** Inhibition of generation of reactive oxygen species by *Hibiscus tiliaceus* L using the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. The ethanol extract showed an IC<sub>50</sub> of 0.375 mg/mL, which reduced the formation of the DHBA species to 15.06 % at the highest concentration (2 mg/mL).....113

## IX-ANEXOS

**Figura 1.** Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*.....149

**Figura 2.** Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidi*.....150

**Figura 3.** Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-negativa *Citrobacter freundii*.....150

**Figura 4.** Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-negativa *Shigella flexneri*.....151

**Figura 5.** Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*..... 151

## LISTA DE TABELAS

## III – CAPÍTULO I

**Table 1.** Some secondary metabolites found in the Hibiscus genus and its pharmacodynamic properties.....79

## IV-CAPÍTULO II

**Table 1.** *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study..... 106

**Table 2.** Determination of total phenols (TP), total tannins (TT) and total flavonoids (TFO)..... 107

**Table 3.** Induction of forward mutation (*can1*) in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with ethanol extract of *Hibiscus tiliaceus L.* in stationary phase.....108

**Table 4.** Effects of ethanol extracts of *Hibiscus tiliaceus L.* on induced mutagenicity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in haploid N123 strain of *S. cerevisiae* in the stationary phase.....109

**Table 5.** Investigation of the *in vitro* antioxidant potential of ethanolic of extract *H. tiliaceus L* by DPPH strategy.....110

## IX-ANEXOS

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do extrato etanólico (*Hibiscus tiliaceus L.*) sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5 µL do extrato por disco.....147

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato *Hibiscus tiliaceus L.*.....152

## RESUMO

O *Hibiscus tiliaceus L.* popularmente chamado no Brasil de “Algodoeiro da Praia”, “Guaxima do Mangue”, “Embira do Mangue” é uma árvore típica da vegetação de ecossistemas costeiros, crescendo também nas margens dos rios e em solos muito úmidos. É utilizado na medicina popular como calmante, na consolidação mais rápida de fraturas, efeito este atribuído à madeira e às flores frescas. O extrato aquoso das suas folhas é utilizado para o tratamento de doenças de pele. Estudos fitoquímicos realizados com as partes aéreas da planta revelaram que as flores desta espécie contêm a gossipetina, quercitina, kaempferol, e que suas flores frescas contêm gossipitrina e o 3-glicosídeo da gossipetina. Outros compostos bastante conhecidos foram identificados nas flores, como a presença de flavonóides, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos, álcoois, vitamina E, aldeídos e fitoesteróides. São poucos os estudos que comprovam a eficácia e a segurança do uso desta planta para fins terapêuticos. Em função disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos antioxidante *in vivo* e *in vitro*, mutagênico/antimutagênico, antibacteriano e determinação do teor de flavonóides, taninos e polifenóis totais do extrato etanólico das flores de *Hibiscus tiliaceus L.* Para os ensaios de atividade antioxidante foram utilizadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes na enzima superóxido dismutase expostas ao agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesta abordagem experimental, o extrato etanólico apresentou significativa atividade antioxidante protegendo as linhagens de levedura contra danos oxidativos induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta atividade antioxidante também foi confirmada *in vitro*, nos testes de DPPH e xantina-oxidase. Os testes de mutagênese e antimutagênese foram realizados em linhagens de *S. cerevisiae* portadoras de marcas genéticas apropriadas. Observou-se que ele não é mutagênico nas doses testadas e reduz, significativamente, a mutagênese induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrando assim um potencial de atividade antimutagênica. No ensaio de atividade antimicrobiana, de concentração inibitória mínima e difusão e placa, todos os microrganismos apresentaram-se suscetíveis ao extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus L.* Considerando que este extrato apresenta um percentual de flavonóides, polifenóis e taninos totais, pode-se sugerir que eles sejam responsáveis, pelo menos em parte, pelas atividades antioxidantes e antimutagênicas encontradas.

## ABSTRACT

*Hibiscus tiliaceus* L., commonly known as linden hibiscus, is a tree native to coastal ecosystems, but it also grows along river banks and consistently humid soils. The species is used in popular medicine as sedative and as an agent to promote the consolidation of fractures. These properties are observed in the trunk and fresh flowers. The aqueous extract of fresh leaves is used to treat skin diseases. Phytochemical studies made with the aerial parts of the plant have revealed that its flowers present gossypetin, quercetin and kaempferol, and that fresh flowers contain gossypitrin and the gossypetrin 3-glucoside. Other very well known compounds were identified in flowers, like flavonoids, hydrocarbons, organic acids, alcohols, vitamin E, aldehydes and phytosteroids. There are only few studies that show the efficiency and safety of this plant for therapeutic purposes. In this sense, the aim of this study was to investigate the in vivo and in vitro antioxidant effects, the mutagenic/antimutagenic and antibacterial properties, as well as to determine the total tannin and polyphenol contents in the ethanolic extract of *Hibiscus tiliaceus* L flowers. For the in vivo antioxidant test, we have used the inhibition growth assay in *Saccharomyces cerevisiae* proficient and deficient in antioxidant defenses, challenged to the oxidative agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this experimental approach the ethanolic extract of the plant exhibited significant antioxidant activity, protecting the yeast cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damage. This antioxidant property was also confirmed in vitro, by the DPPH and xantine-oxidase assay. The mutagenic and antimutagenic assays were made in *Saccharomyces cerevisiae* strains presenting the appropriate genetic markers. The results obtained reveal that the extract is not mutagenic in the tested doses and demonstrates a potential antimutagenic action. In the antimicrobial assay, by minimum inhibitory concentration and in the plate diffusion assays, the ethanolic extract of *H. tiliaceus* L. flowers revealed that all organisms were susceptible to the extract. Considering that the extract presents a percentage of flavonoids, polyphenols and total tannin contents, one may suggest that they may be responsible, at least partly, for antioxidant and antimutagenic properties found.

## **I - INTRODUÇÃO**

Desde o início dos tempos, o homem tem utilizado espécies vegetais como alimento e agente terapêutico para fins de tratamento e cura de doenças. Como exemplos clássicos desta prática farmacológica, podemos citar a medicina milenar chinesa e indiana (ayurvédica). Nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, devido à pobreza e à falta de acesso à medicina moderna, a maior parte da população depende essencialmente do conhecimento sobre plantas medicinais para seus cuidados de saúde, pois, muitas vezes, é o único recurso terapêutico de muitas comunidades. Desse modo, as informações terapêuticas acumuladas durante séculos têm sido utilizadas como guia para pesquisas farmacológicas, comprovando a importância da etnofarmacologia. Esses fatos estimularam o interesse médico pelas plantas e algumas destas já têm sido cientificamente estudadas para avaliar a sua qualidade, segurança e eficácia (MACIEL *et al.*, 2002; CALIXTO, 2005; MICHELIN *et al.*, 2005; NOLDIN *et al.*, 2006).

Em 1978 a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu os medicamentos fitoterápicos como recurso terapêutico. Assim rapidamente os produtos naturais voltaram a ser vistos como fonte de medicamentos, levando ao desenvolvimento de muitos fármacos importantes como a artemisina (antimalárico), paclitaxel, topotecan (quimioterápicos) e extratos de *Ginkgo biloba* (tratamento de problemas vasculares), entre outros (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001; LORENZI & MATOS, 2002). Extratos vegetais e seus constituintes isolados podem ser usados na fabricação de produtos terapêuticos industrializados (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas com finalidade terapêutica (FETROW & AVILA, 2000).

Para a utilização segura dos fitoterápicos, a padronização é necessária para garantir a autenticidade do fármaco na planta e seu conteúdo de substâncias ativas de acordo com os parâmetros utilizados como critérios de qualidade. Os métodos cromatográficos são aplicados para o controle de qualidade de plantas medicinais devido às suas diversas vantagens, como alta eficiência, rapidez e a possibilidade de sua utilização em sistemas automatizados (CELEGHINI *et al.*, 2001; LOPES *et al.* 2004). O isolamento de substâncias ativas de plantas tem contribuído para o fortalecimento da indústria farmacêutica, sem a qual a produção e caracterização na forma sintética de muitas estruturas químicas complexas seriam inviáveis técnicas e economicamente. Por possuírem

alta diversidade molecular, tais substâncias podem ser utilizadas em processo de semi-síntese ou para modificações estruturais, propiciando o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes ou menos tóxicos (MONKS *et al.*, 2002; NOLDIN *et al.*, 2006).

Em grande parte, os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais e frutas possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos e até anticarcinogênicos (KUSAMRAN *et al.*, 1998; NAKAMURA *et al.*, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2005). Enfim, os extratos de muitas plantas podem ser usados no tratamento de várias doenças humanas (YEN *et al.*, 2001). Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar metabólitos com esta mesma atividade. Segundo AMES (1983) e LOPES *et al.* (2004), elementos presentes em vegetais da dieta humana, podem ter uso tanto medicinal como podem apresentar substâncias nocivas para o organismo (HALLIWELL, 2007).

Neste contexto, as espécies do *Hibiscus* utilizadas na medicina popular na China e leste da Ásia, com fins profiláticos e curativos de infecções e inflamações compreendem um grande grupo de plantas medicinais, que podem ser reconhecidas pelas suas aplicações terapêuticas, sob aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos. Desta forma, existe o interesse em estudar as atividades biológicas da espécie *Hibiscus tiliaceus* L.

## **1. A PLANTA *Hibiscus tiliaceus* L.**

### **1.1 Generalidades**

A família vegetal das malváceas está composta por aproximadamente 85 gêneros e 1500 espécies, distribuídas pela maior parte do planeta, sendo particularmente abundante na América Tropical. Os membros desta família, de ocorrência espontânea nas Américas, são constituídos por 27 gêneros e aproximadamente 200 espécies, incluindo nestas o gênero *Hibiscus* (WEBBER, 1934). A espécie *Hibiscus tiliaceus* L. é conhecida no Brasil pelos nomes vulgares de “Algodoeiro da Praia”, “Guaxima do Mangue”, “Embira do Mangue” (SOAVE, *et al.*, 1990).

A classificação taxonômica desta espécie foi feita por SCHULTZ (1963), que a considerou dentro da ordem Malvales, família Malvacea, gênero *Hibiscus* e espécie *Hibiscus tiliaceus*. É uma árvore típica da vegetação de ecossistemas costeiros, crescendo também nas margens dos rios e em solos muito úmidos. Segundo CORREA (1984), *H. tiliaceus* é um arbusto ou árvore de tronco tortuoso, de até 5 m de altura e 10 cm de diâmetro, fortemente ramificado desde a base, com casca um pouco rugosa e de cor variável, entre o branco e acinzentado e castanho claro. Suas flores são grandes, de cor amarelo sulfuroso (Figuras 1 e 2), sem mácula alguma na base da pétala, e apresentam corola bem aberta, de 8 cm, com 2 cm. A espécie *H. tiliaceus* é encontrada ao longo de toda a costa do mar, desempenhando uma função geológica de alta relevância, como a de fixar os terrenos.



**Figura 1.** Flor do *Hibiscus tiliaceus* L.



**Figura 2.** Partes aéreas do *Hibiscus tiliaceus* L.

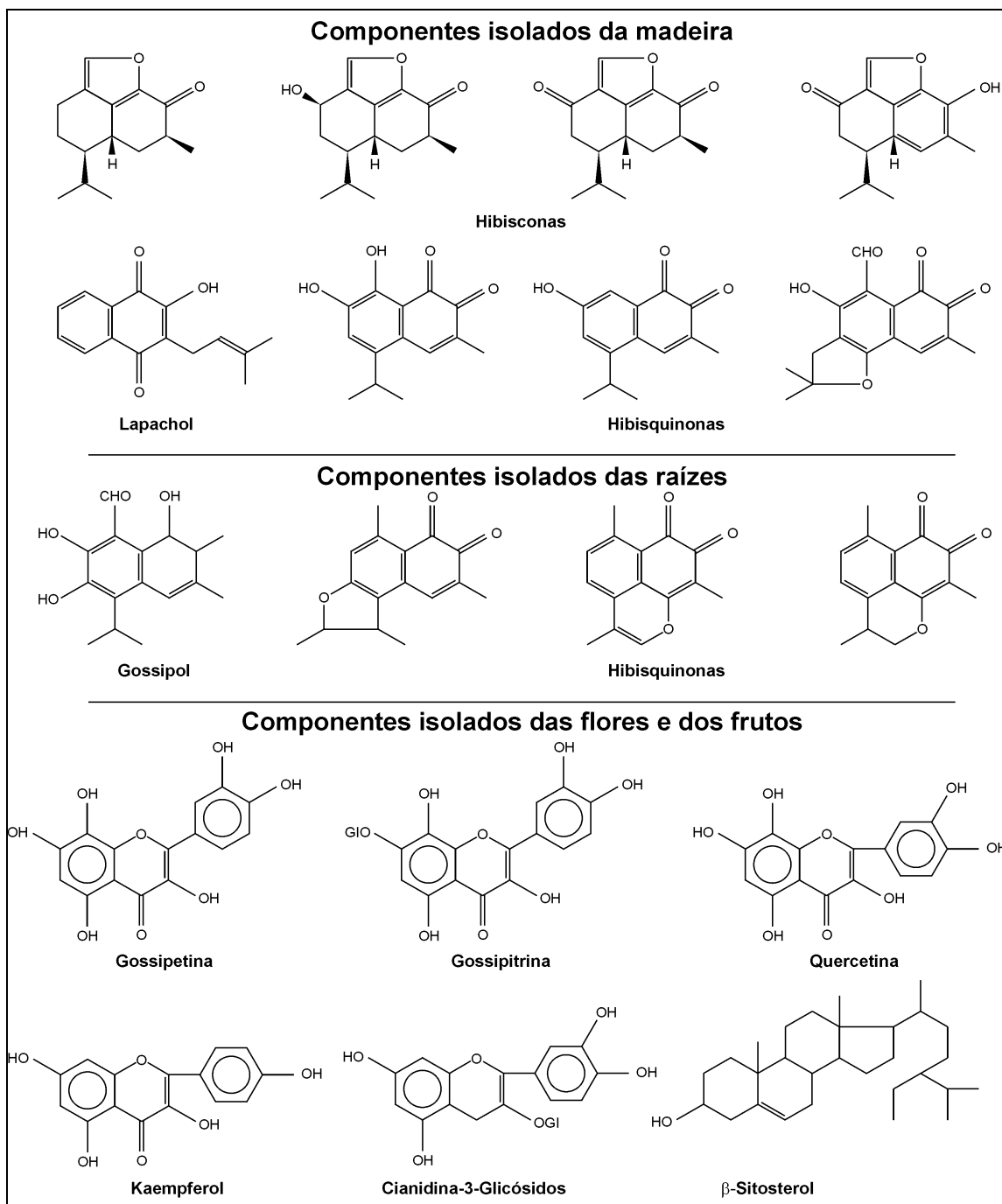


## 1.2 Composição Química

As primeiras informações sobre a composição química do gênero *Hibiscus* foram publicadas por VISWESWARA *et al.*, (1946), que conseguiram separar das flores do *Hibiscus* o glicosídeo flavonol gossipetina, como componente majoritário e a quercitina, como componente minoritário.

CHEN *et al.*, (1993), descreveram o isolamento de nove componentes a partir das flores secas de *Hibiscus*, identificados como nonacosano, beta-sitosterol, ácido betulínico, éster hexílico do ácido esteárico, estigmastan-3,7-dion, estigmasta-4-en-3-ona, álcool tetratriacontílico, quercitina e kaempferol. LOWRY (1975) descreve que a cianidina-3-glucosídeo está entre o componente mais comum encontrado nas flores deste *Hibiscus*. POPP (1984) informa a presença de íons inorgânicos e ácidos orgânicos, mas não armazena íons inorgânicos como sódio e cloreto nas partes das folhas jovens.

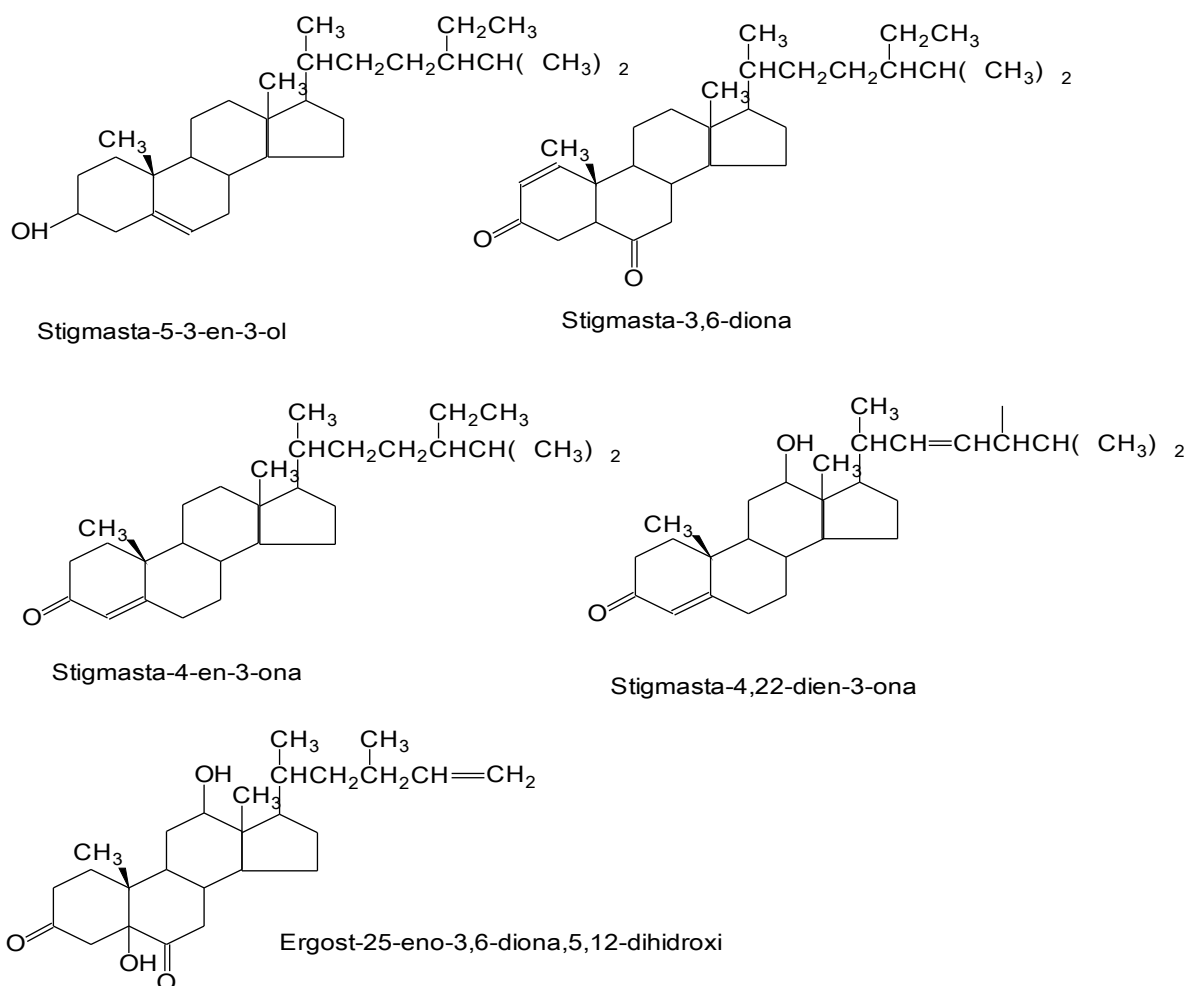
JAROSZEWKI *et al.*, (1992), realizando uma análise de 90 espécies do gênero *Hibiscus* isolaram hibisquinona e hibiscona como componentes presentes na madeira e raízes no *Hibiscus tiliaceus* L (Figura 3).



**Figura 3.** Estruturas químicas de alguns componentes isolados de *Hibiscus tiliaceus* L. na madeira, raízes, flores e frutos (Gros *et al.*, 1985).

SANKARA *et al.*, (1961), demonstraram que as flores desta espécie (Figura 3) contêm a gossipetina, quercetina, e kaempferol, e que suas flores frescas contêm gossipitrina e o 3-glicosídeo da gossipetina. Em estudos mais recentes, foi encontrada nas flores do *H. tiliaceus* a presença de hidrocarbonetos, ácidos orgânicos, álcoois, vitamina E, aldeídos e fitoesteróides (Figura 4) (MELECCHI, 2005; ROSA *et al.*, 2006; 2007).

YANG *et al.*, (2008), verificaram que esta espécie possui índices extremamente elevados de polissacarídeos, metabólitos secundários e especiais de polifenólicos em seus vários tecidos como as folhas, flores e raízes.



**Figura 4.** Estrutura de fitoesteróides identificados do *Hibiscus tiliaceus* L. (Rosa *et al.*, 2006).

### **1.3 Uso na medicina tradicional**

Algumas ações biológicas têm sido relatadas na literatura para os produtos obtidos de diferentes órgãos da planta *Hibiscus tiliaceus* L. KOBAYASHI *et al.*, (1976), relataram a ação espermicida do extrato aquoso da madeira, e também um efeito contraceptivo dos princípios ativos das flores. BRONDEGAARD (1973) registrou o efeito contraceptivo dos princípios ativos das flores, que são amplamente utilizadas como anticoncepcionais na medicina tradicional dos países asiáticos e africanos embora, no Brasil, se desconheça esse uso.

KHOLKUTE *et al.*, (1977) estudaram a potencialidade no tratamento da infertilidade de mamíferos de diferentes extratos obtidos a partir de flores, folhas da espécie do gênero *Hibiscus*. As amostras foram coletadas nas quatro estações do ano e apenas o extrato benzênico das flores apresentou efeito significativo.

WHISTER (1995) estudou o uso do extrato aquoso desta planta na consolidação mais rápida de fraturas, efeito este atribuído à madeira e às flores frescas, e também demonstrou a utilização do extrato aquoso das folhas para o tratamento de doenças de pele.

TELEFO *et al.*, (1998), avaliaram as mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorridas no sistema reprodutivo de ratas, provocados por diferentes doses de extratos. Observaram significativo aumento dos órgãos reprodutivos (útero e ovário), a uma velocidade muito superior a dos grupos de controle, assim como aumento nos níveis de proteína do útero, concluindo que estes resultados poderiam ser devido à presença de compostos estrogênicos no extrato da planta.

## **2. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS**

O estudo fitoquímico compreende geralmente quatro etapas bem definidas (LOCK DE UGAZ, 1994): coleta e classificação botânica da espécie a estudar; extração, separação e purificação dos constituintes químicos; determinação estrutural e ensaios biológicos e farmacológicos.

Do ponto de vista farmacêutico, a extração refere-se à separação – a partir dos tecidos das plantas e animais, mediante o uso de solventes seletivos e utilizando procedimentos estabelecidos – de suas porções farmacologicamente ativas (BOMBARDELLI, 1991). As partes em estudo da planta (folhas, flores, frutos, raízes) determinarão, fundamentalmente, os procedimentos a serem utilizados, podendo-se aplicar métodos contínuos ou descontínuos, a temperaturas ambientes ou com aplicações de calor (MARCANO & HASEGAWA, 1991).

Um dos métodos de extração muito utilizados é o de maceração, que consiste em por em contato a droga com quantidade de solvente preestabelecida, à temperatura ambiente, em recipiente fechado, durante 2 a 14 dias. A maceração é um processo não seletivo que resulta em um equilíbrio de concentração entre droga e solvente (MELECCHI, 2005).

A extração com Soxhlet é um método contínuo muito utilizado na extração de compostos orgânicos, mas apresenta restrições ligadas ao tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (MIGUEL *et al.*, 1989). Neste processo o solvente extrai o material orgânico retido na amostra, à temperatura próxima à do ambiente.

## **2.1 Extração por ultra-som**

O ultra-som (Figura 5) é um processo de extração que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano. Estas ondas criam uma variação na pressão do extrato empregado no processo de extração, gerando cavitação.

A utilização do ultra-som pode ser dividida em duas áreas: 1 - alta potência, que se caracteriza pela elevada frequência, pequena translocação, moderada velocidade e alta aceleração e 2 - baixa potência que se caracteriza pela baixa amplitude de propagação, e é utilizada no campo da ciência, engenharia e medicina, para ensaios e diagnóstico técnico (BARBOZA *et al.*, 1992).

Principais aplicações das ondas ultras-sônicas de alta potência:

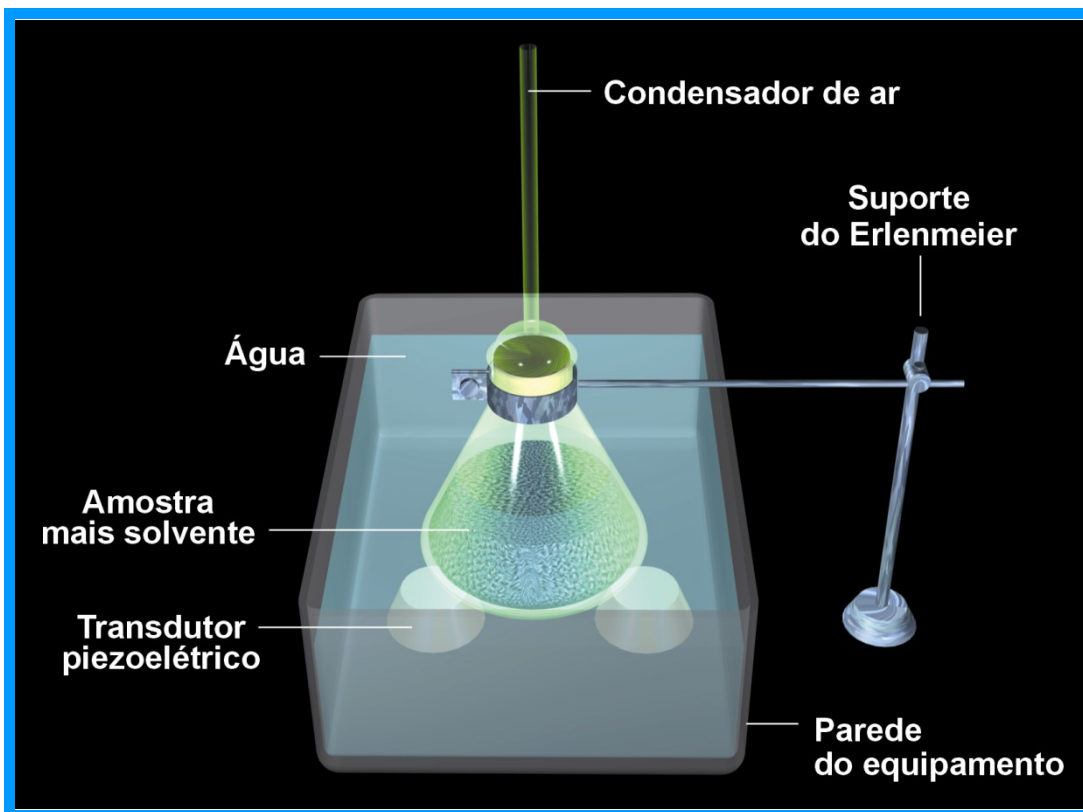
- Na biologia: aplicação na homogeneização, rompimento de células e extração de componentes em tecidos de plantas e animais;
- Na geologia: localização de minerais e depósitos de óleos;
- Na medicina: esterilização, fisioterapia e inalações;
- Na física: velocidade do som, cavitação e fenômeno das ondas acústicas.

A extração desta técnica é citada como sendo igual, ou melhor, que a obtida como extrator Soxhlet, apresentando as vantagens de alta reprodutibilidade, possibilidade de utilização para uma ampla gama de tamanhos de amostra, rapidez no processamento e baixo custo (KOH, 1983; SARGENTI *et al.*, 2000).

Os principais efeitos do ultra-som empregados como técnicas de extração são: aumento da permeabilidade da parede celular, a produção de cavitação e aumento da tensão das células (também denominado interface de fricção) (LIST & SCHIMIT, 1989).

O emprego do ultra-som tem sido como método alternativo ao Soxhlet, pois é aplicado em diferentes compostos orgânicos (TOMA *et al.*, 2001), e seu efeito no processo de extração depende da frequência e capacidade do equipamento e do tempo empregado para extração. VINATORU *et al.*, (2001) e TOMA *et al.*, (2001), empregam a informação que a transformação química do extrato depende da utilização de longos tempos de extração.

MELECCHI (2005), em uma análise conjunta de extração realizada, permitiu afirmar que a extração por ultra-som, em termos de rendimento, é superior à maceração, com qualquer solvente empregado. Em relação à extração por Soxhlet, a extração com ultra-som resulta mais eficiente quando o solvente empregado é de maior polaridade. Quando se compara a técnica de extração com fluido supercrítico à técnica com ultra-som resulta que é mais eficiente para todos os solventes empregados



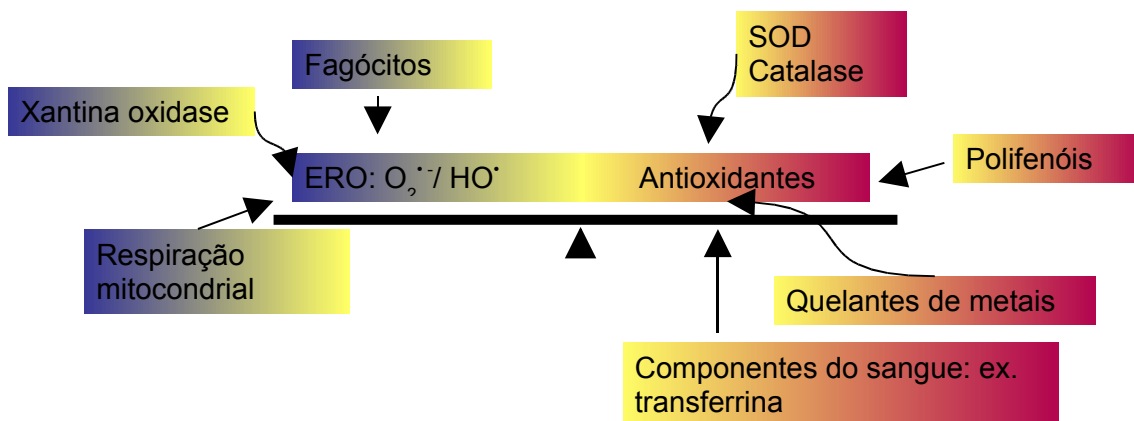
**Figura 5.** Esquema da Extração por Ultra-som (MELECCHI, 2005).

### 3. ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES

A capacidade pró-oxidante e antioxidante das células devem ser mantidas em equilíbrio (Figura 6) a fim de evitar o perigo potencial do estresse oxidativo (SIES, 1997). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, podendo lesar componentes celulares, inclusive o DNA, modificando sua estrutura e/ou função (HALLIWELL, 2008; 2009).

Este estresse pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, pela elevada produção de radicais livres, ou por ambos os processos simultaneamente (HALLIWEL, 2008). Distúrbio do equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é associado a uma série de processos

patológicos, como por exemplo, câncer, isquemia, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, como o envelhecimento (PAWLAK *et al.*, 1998; BECKMAN & AMES, 1998, revisado por SALVADOR & HENRIQUES, 2004; MOURA *et al.*, 2007; HALLIWELL, 2007; 2008).



**Figura 6.** Representação esquemática do balanço entre estresse oxidativo e os antioxidantes *in vivo* (Adaptado de HALLIWELL, 2008).

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, quando presentes em concentrações baixas, quando comparada com a de um substrato oxidável, retardam significativamente, ou previnem a oxidação daquele substrato, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2007; 2009).

Para proteger o organismo do ataque destas ERO existe uma série de sistemas de defesa antioxidante, como enzimas específicas que inativam algumas delas; enzimas que controlam a disponibilidade de metais na célula; captadores não protéicos de radicais; e em



paralelo, os sistemas de regeneração e reparação de macromoléculas danificadas, especialmente o DNA, que pode corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; PIETTA, 2000; LUSHCHAK & GOSPODARYOV, 2005, HALLIWELL, 2007).

A atividade antioxidante pode ser avaliada com diferentes testes ou por diferentes métodos. Os métodos mais frequentemente utilizados para medir os danos oxidativos são: (1) ação oxidativa total do DNA; (2) níveis antioxidantes enzimáticos e de vitaminas; (3) ação oxidativa em lipídios e (4) ação nas proteínas (ARUOMA, 1997 SIERRA & MAZZA, 2007). A maioria dos métodos químicos é baseada na capacidade de captura dos radicais livres. Também podem ser medidos por absorção UV e capacidade de quelação que são os responsáveis pela atividade antioxidante dos óleos (ARUOMA, 1997). Testes que avaliam a captura dos radicais livres podem ser feitos com diferentes compostos, como peróxido ( $O_2^{\cdot}$ ), hidroxila (OH), óxido nítrico (NO), radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), entre outros (SIERRA & MAZZA, 2007). Dentre estes, destacamos o método químico *in vitro* da hipoxantina/xantina oxidase e o método de avaliação da atividade *in vivo* com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por estarem ligados aos objetivos do presente estudo.

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não enzimático e/ou sistema de defesa antioxidante enzimático. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH) e polifenóis diminuem a ação tóxica das ERO produzidas intra e extracelularmente. No segundo caso, devido à formação de níveis basais de ERO, os organismos sintetizam enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases (Sod), catalase (Cat), glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona-redutase (GR) (BECKMAN & AMES, 1998; PAWLAK *et al.*, 1998) BONNEFOY *et al.*, 2002)

### **3.1 Antioxidantes enzimáticos**

Em células eucarióticas, os principais sistemas antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px), as quais catalisam a redução dos oxidantes, prevenindo a formação de ERO (PIETTA, 2000; VALKO *et al.*, 2006).

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ) (LUSHCHAK, 2006), sendo encontrada em diferentes isoformas, diferindo na natureza do metal ativo e nos diferentes papéis na proteção dos organismos do estresse oxidativo.

Entre as SOD mais importantes estão a SODCuZn, que possui cobre ( $Cu^{2+}$ ) e zinco ( $Zn^{2+}$ ), codificada pelo gene *SOD1*, e está presente principalmente no citosol das células; a SODMn com um íon de manganês ( $Mn^{3+}$ ) em cada uma de suas subunidades, que é codificada pelo gene *SOD2* e está localizada primariamente na mitocôndria, protegendo-a de ERO gerados durante respiração e exposição ao etanol (PEREIRA *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2006); e a SODEC, que contém  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  e atua no espaço extracelular. As catalases citosólicas e peroxissomais convertem  $H_2O_2$  à água ( $H_2O$ ) e  $O_2$  (WILMSEN *et al.*, 2005). A glutathiona peroxidase também reduz o  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e seus peróxidos orgânicos a seus respectivos álcoois, através da conversão da glutathiona reduzida ao dissulfeto correspondente glutathiona oxidada (GRANT *et al.*, 1998; HENRIQUES *et al.*, 2001; VALKO *et al.*, 2007).

### **3.2 Antioxidantes não enzimáticos**

Entre os antioxidantes não enzimáticos pode-se citar a vitamina C, vitamina E, ubiquinol, carotenóides e flavonóides (CAI *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2006). A vitamina C elimina os radicais livres do plasma, citosol e outros compartimentos aquosos. A vitamina E, e outros antioxidantes hidrofóbicos atuam fundamentalmente nas membranas e nas bicamadas lipídicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; VALKO *et al.*, 2007; HALLIWELL, 2007). Por ser um agente redutor potente, o ácido ascórbico possui uma

excelente capacidade antioxidante, podendo seqüestrar eficientemente inúmeras ERO. Ao reagir com as ERO, o ácido ascórbico é oxidado a ácido desidroascórbico, podendo ser convertido de volta à forma reduzida à custa de GSH ou de NADPH. Também pode regenerar o  $\alpha$ -tocoferol de sua forma radical oxidada e contribuir indiretamente na defesa antioxidante lipídica (MAXWELL, 1995; KHAN & MUKHTAR, 2008).

A vitamina C é capaz de exercer propriedades pró-oxidantes *in vitro*, reagindo com íons ferro e cobre, produzindo  $H_2O_2$  e OH (HALLIWELL, 2009). As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico *in vitro* são várias, porém *in vivo* as evidências de sua ação são limitadas, mesmo sendo as concentrações plasmáticas do mesmo suficientes para exercer efeitos antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; HALLIWELL, 2009).

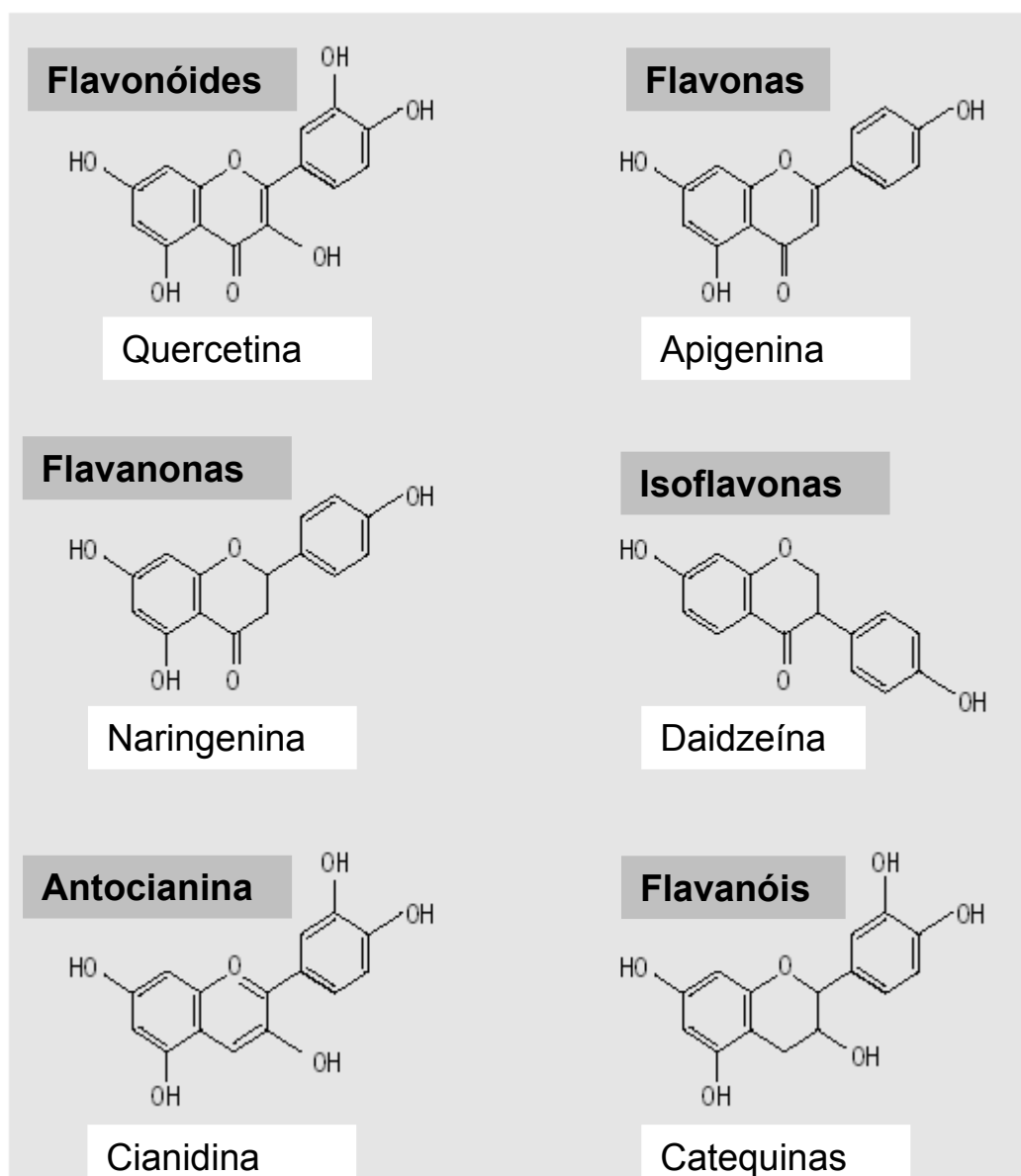
### 3.2.1 Flavonóides

Dentre os polifenóis com atividade antioxidante expressiva, têm-se os flavonóides. As seis maiores e mais estudadas subclasses de flavonóides incluem as antocianidinas, flavanonas, flavonas, flavanóis, catequinas e isoflavonas (Figura 7) (ROSS & KASUM, 2002; DANI *et al.*, 2007; **DE ARCHIVIO *et al.*, 2007**). A atividade antioxidante dos flavonóides refere-se ao fato de serem quelantes de metais, varredores de radicais livres (RL), inclusive radical hidroxila (TRUEBA & SÁNCHEZ, 2001). Os polifenóis são compostos com um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (HUSAIN *et al.*, 1987; AFANASAV *et al.*, 1989; MELLO & SANTOS, 2002; ZUANAZZI, 2002). Os compostos polifenólicos estão presentes em frutas e vegetais como nozes, sementes, ervas, especiarias, flores, em diversos chás e vinhos tintos, muito consumidos na dieta humana (LOPES, 2004; VALKO *et al.*, 2007; DANI *et al.*, 2007).

Os flavonóides são compostos polifenólicos encontrados em vários alimentos, incluindo frutas, vegetais, chás e vinhos, podendo ter alguma influência na relação entre

dieta e doenças (MAXWELL, 1995; DANI *et al.*, 2007; **DE ARCHIVIO *et al.*, 2007**). Estes estão entre os princípios ativos mais distribuídos em plantas na natureza, no qual mais 3.000 substâncias já foram descritas na literatura. A função dos flavonóides nas plantas é a de proteção, principalmente contra os raios solares nocivos; além de propiciar a coloração amarela das flores. A localização dos flavonóides está habitualmente, nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, nas camadas paliçadas, nos parênquimas esponjosos, dissolvidos no suco celular sob a forma de heterosídeos; quando o conteúdo atinge um valor elevado aparecem sob a forma de cristais ou de massas coradas de amarelo. As principais ações farmacológicas conhecidas dos flavonóides são: ação antiinflamatória, ação antimicrobiana, inibição a respiração celular, ação citotóxica, ação espasmolítica, ação antioxidante e confere a resistência dos vasos capilares, melhorando a permeabilidade capilar (**DE ARCHIVIO *et al.*, 2007**; STEVENSON & HURST, 2007).

A estrutura química dessas moléculas pode-se apresentar em diversas formas, sendo que a maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono e são baseados no esqueleto C6 – C3 – C6 com um anel cromano ligado a um segundo anel aromático nas posições 2, 3 ou 4, com os seus subgrupos mais importantes: flavona, flavononas, flavanóis, antocianidinas e isoflavona (Figura 7).



**Figura 7.** Estrutura química dos flavonóides e seus subgrupos mais importantes (Adaptado DE ARCHIVIO, 2007).

Os flavonóides *in vitro* são fortes inibidores da peroxidação lipídica, atuando como seqüestradores do ERO, ligantes de íons metálicos e inibidores da lipoxigenase e ciclooxigenase (HALLIWELL, 2009).

A literatura propõe que os flavonóides exerçam efeitos benéficos em diversos estados patológicos, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e em distúrbios neurovegetativos. Estima-se que o valor médio diário de ingestão de flavonóides seja de 23 mg/dia, e sua excreção ocorre primordialmente pela urina, dada sua solubilidade em água (HALLIWELL, 2008; 2009). Muitas ações biológicas destes compostos são atribuídas pelas suas propriedades antioxidantes, e sua possível influência do estado redox intracelular. O mecanismo exercido pelos flavonóides, para estas ações benéficas e tóxicas, ainda permanece pouco conhecido. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que sua atividade antioxidante clássica de doação de hidrogênio é pouco provável ser a única explicação para os efeitos celulares benéficos sugeridos (RICE-EVANS, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996; RICE-EVANS, 2001; MCCUNE, & JOHNS, 2002; KHAN & MUKHTAR, 2008).

Os flavonóides desempenham um papel importante na inibição da carcinogênese, mutagênese, e doenças cardiovasculares, estando esta sua inibição relacionada com a atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* (HALLIWELL, 2009).

Os flavonóides possibilitam a inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pelos macrófagos, contribuindo também para reduzir a citotoxicidade das LDL já oxidada (HALLIWELL, 2008; 2009). A catequina e a quercetina são os maiores exemplos de flavonóides que inibem a oxidação, e junto com o kaempferol inibem a oxidação do ácido linoleico. Diversos flavonóides revelaram a capacidade de inibir a expressão do óxido nítrico sintetase e a formação de óxido nítrico em macrófagos. Os flavonóides presentes nos vegetais, frutas e chás apresentam a capacidade de capturar os seguintes radicais: hidroxil, peróxido, superóxido, óxido nítrico e DPPH (STEVENSON & HURST, 2007). A catequina, epicatequina e o ácido gálico diminuem as quebras de cadeia simples de DNA provocados pelo óxido nítrico e pelo ânion nitroxilo. Os flavonóides inibem as enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, a xantina oxidase e a proteína cinase C. Estes compostos inibem também a ciclo-oxigenase, lipo-oxigenase, mono-oxigenase microsomal, glutatona S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase, estando todas as enzimas descritas envolvidas na geração de ERO (STEVENSON & HURST, 2007; HALLIWELL, 2008; 2009). Devido aos seus pequenos potenciais redox,

os flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radical extremamente oxidante, como o superóxido, peroxil, alcoxil e hidroxil através da doação de hidrogênio. A atividade antioxidante dos flavonóides encontra-se dependente das reações laterais do radical aroxilo (KHAN & MUKHTAR, 2008).

Nos indivíduos, sabe-se que o primeiro local onde os flavonóides desempenham inicialmente o seu primeiro papel como antioxidante é no trato intestinal, limitando a formação de ERO e capturando os ERO formados (HALLIWELL, 2008; 2009). A quercitina inibe a peroxidação lipídica produzida pelo ferro e inibe a produção de oxido nítrico no fígado, alterando vias de expressão de proteínas celulares. O consumo de suco de uva preta protege contra a oxidação das LDL. Deste modo, os flavonóides presentes neste tipo de suco e também no vinho tinto exercem um papel importante na prevenção da arteroesclerose (KHAN & MUKHTAR, 2008).

PRATT & BIRAC (1979) estudaram vários flavonóides, como a quercetina, quercitrina, miricetina, quercetina 3-monoglicosídeo, quercetina 3-triglicosídeo, extraídos de sementes de diversas plantas como antioxidantes, utilizando etanol absoluto e fazendo determinações espectrométricas a 258nm. Vários antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, também foram encontrados em muitos vegetais, conforme trabalhos realizados por HAREL & KANNER (1984), FARR *et al.* (1988), SHEABAR & NEEMAN (1988), NAMIKI (1990), PRATT & HUDSON (1990), KANNER *et al.* (1994), STEVENSON & HURST, (2007).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos, a saber: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados

a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres. Isômeros do ácido clorogênico e do ácido caféico são descritos com antioxidantes (BELITZ & GROSCH, 1988; DURÁN & PADILLA, 1993).

No grupo dos ácidos hidroxibenzoicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuico, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos têm apresentado propriedades antioxidantes (STEVENSON & HURST, 2007). Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula (RAJALAKSMI & NARASIMHAN, 1995; STEVENSON & HURST, 2007).

A hidroxila do ácido ferúlico existente na posição orto com o grupo metoxila, doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil e aumenta a eficiência antioxidante do composto (CUVELIER *et al.*, 1992). A presença de uma segunda hidroxila na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante. O ácido caféico, que apresenta essa característica, possui uma atividade antioxidante maior do que o ácido ferúlico (CHEN & HO, 1997). O efeito seqüestrante do radical hidroxil parece estar diretamente relacionado aos grupos hidroxil localizados na posição para no anel aromático. Os ácidos sináptico, ferúlico e p-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzoico, tais como ácido procatecuico, siríngico e vanílico. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico ( $\text{-HC=CHCOOH}$ ), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzoico não apresentam essa característica (WANASUNDARA *et al.*, 1994; KHAN & MUKHTAR, 2008).

#### **4. MUTAGÊNESE E ANTIMUTAGÊNESE**

Nos últimos anos, a pesquisa farmacológica tem encontrado muitas substâncias presentes em vegetais, as quais têm sido consideradas como uma alternativa para escapar dos processos de mutagênese e/ou carcinogênese, devido às suas propriedades químio



preventivas de mutações ao DNA e de interferência nas etapas de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (CAMBIE & FERGUSON, 2003; LEE & PARK, 2003; ZHANG *et al.*, 2006; CHUNG, *et al.*, 2009).

A antimutagênese pode ocorrer em diferentes níveis: a) prevenção da formação de metabólitos mutagênicos; b) captura dos agentes mutagênicos pelas enzimas ou pelos componentes celulares dos tecidos; c) neutralização das lesões pré-mutagênicas e d) modulação dos mecanismos que aumentam a inativação metabólica de compostos mutagênicos (ZHANG *et al.*, 2006).

O aumento do consumo de alimentos contendo componentes químico preventivos pode melhorar a proteção contra danos causados por compostos mutagênicos e carcinogênicos (LEHMANN *et al.*, 2000; BOEIRA *et al.*, 2001). Esta melhora tem levado a um aumento no interesse da população sobre os possíveis efeitos antimutagênicos de produtos naturais ou compostos químicos. De acordo com WALTERS *et al.*, (1990) o termo antimutagênico foi usado originalmente para descrever aqueles agentes que induzem redução da frequência de mutações espontâneas ou induzidas.

Como grandes produtos naturais que apresentam potencial antimutagênico estão os vegetais, frutas cítricas, ervas e condimentos, além de componentes de alimentos como as vitaminas A, C, E e flavonóides (ZHANG *et al.*, 2006 ). Espécies reativas de oxigênio podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas espécies estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações fisiopatológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese (ZHANG *et al.*, 2006; CHUNG, *et al.*, 2009).

Estudos laboratoriais têm identificado um grande número de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos presentes nas plantas, na dieta humana (HERRAIZ & CHAPARRO, 2005). HAYATSU *et al.*, (1988) e HILBER & CHAPILLON, (2005), verificaram que substâncias preventivas obtidas por meio de alimentos, diminuem a

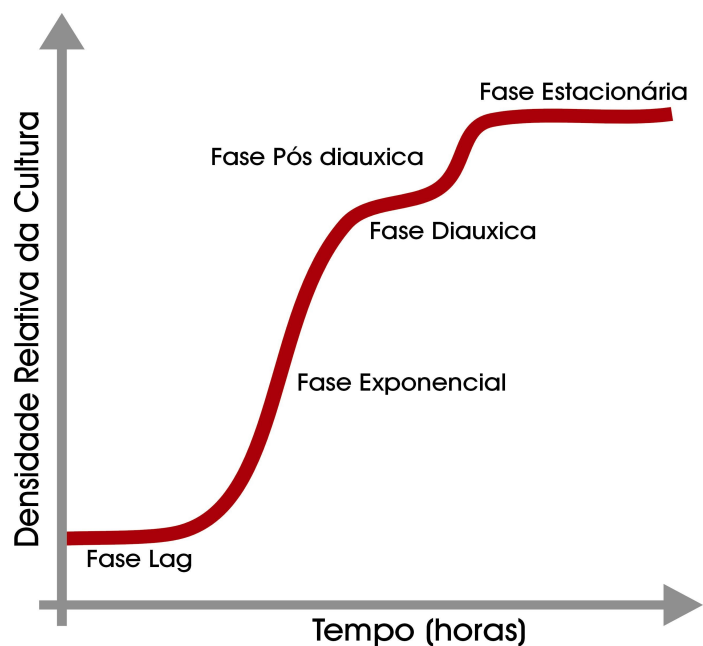
atividade mutagênica, produzindo produtos celulares que reduzem a taxa de mutação, diminuindo a incidência de câncer.

## **5. A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDO**

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo eucariótico amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se referem às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA & FERREIRA, 2001).

As leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias e, portanto, são expostas continuamente as ERO geradas como bioprodutos do metabolismo (COSTA & FERREIRA, 2001). A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas, sendo a glicose a principal fonte de carbono da *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e proteínas usualmente conhecidas como repressão da glicose ou repressão catabólica (GANCEDO, 1998; CYRNE *et al.*, 2003; DANI, 2008).

Este crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (Figura 8). Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD – 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após a transição diáuxica, a célula reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (PRINGLE & HARTWELL, 1982; FUGE & WERNER, 1997).



**Figura 8.** Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (Adaptado de FUGE & WERNER, 1997).

### 5.1 Defesas antioxidantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Como todos os aeróbios, a *S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividade enzimática, presença de antioxidantes, sequestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (MARIS *et al.*, 2001; BROZMANOVA *et al.*, 2001; HENRIQUES *et al.*, 2001; DANI *et al.*, 2008).

As superóxido dismutase (SOD) são enzimas que fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. A levedura *S. cerevisiae* contém a SodMn (produto do gene *SOD2*) localizada na matriz da mitocôndria e SodCuZn (produto do gene *SOD1*) presente no citoplasma, núcleo e lisossomos (GRALLA & VALENTINE, 1991; GRALLA & KOSMAN, 1992; LONGO *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1998; LONGO *et al.*, 1999). As linhagens mutantes *sod1Δ*, que são deficientes nesta enzima, apresentam problemas de crescimento em condições aeróbias. São muito sensíveis a hiperóxia (BILINSKI *et al.*,

1985), a substâncias envolvidas em reações tipo ciclo-redox, tais como paraquat ou menadiona, perdem a viabilidade em fase estacionária e são auxotróficas para metionina e lisina em presença de oxigênio (SRINIVASAN *et al.*, 2000). Acredita-se que estas auxotrofias se devem a enzimas relacionadas à síntese destes aminoácidos, que seriam extremamente sensíveis à desativação por  $O_2^{\bullet-}$  (LIU *et al.*, 1992, SLEKAR *et al.*, 1996). As mutantes *sod2Δ* são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não-fermentáveis. A sensibilidade a hiperóxia é revertida pela mutação *rho<sup>0</sup>* (leveduras sem mitocôndrias), confirmando o papel decisivo da mitocôndria na geração de  $O_2^{\bullet-}$  (GUIDOT *et al.*, 1993; FERNANDEZ-CHECA *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 2007).

Mutantes *sod1Δ* e *sod2Δ* mostram níveis de ferro, detectado por ressonância paramagnética de elétron (EPR), de até cinco vezes maiores em relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica, enquanto a dupla mutante *sod1Δsod2Δ* apresenta níveis de ferro superiores a nove vezes o encontrado para a selvagem, em condições aeróbias de crescimento. O tratamento da linhagem selvagem com um gerador de superóxido - paraquat, também aumentou o ferro detectável por EPR, indicando que o excesso de ferro livre pode ser devido aos efeitos deletérios do radical superóxido (SRINIVASAN *et al.*, 2000; HENRIQUES *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2007).

Pela simplicidade do cultivo e caracterização genética, as fases de crescimento características e controláveis e sua marcante semelhança aos sistemas de estudo em eucariotos superiores, como a mutação *sod2Δ* em ratos, fazem da levedura um sistema modelo ideal para estudo de danos oxidativos e funções mitocondriais (LONGO *et al.*, 1999).

Linhagens isogênicas de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox da célula (BRENNAN & SCHIESTK, 1998; LEE *et al.*, 2001). Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de

defesa antioxidante. Pode-se também combinar um oxidante conhecido, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, t-BOOH (peróxido de *terc*-butil) e paraquat, com uma substância com potencial antioxidante. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (HENRIQUES *et al.*, 2001; MARIS *et al.*, 2000; PICADA *et al.*, 2003).

## **5.2 O estudo de substâncias com atividades pró-e/ou antioxidante – modelos *in vivo* e *in vitro*.**

A levedura *S. cerevisiae* vem sendo utilizada como modelo de estudo experimental de proteção antioxidante em estudos de reparo do DNA. Linhagens isogênicas deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox celular (BRENNAN & SCHIESTL, 1998; LEE *et al.*, 2001; HENRIQUES *et al.*, 2001). Um método utilizado consiste em comparar a sensibilidade ao tratamento com um agente físico (por exemplo, radiação) ou químico (por exemplo, pró/antioxidante), de diversas mutantes deficientes em enzimas antioxidantes ou em um fator de transcrição sensível ao estado redox, como o Yap1p, ou ainda deficiente na síntese de GSH, a fim de avaliar a importância de cada defesa antioxidante celular na desintoxicação do agente testado. Também é possível combinar um oxidante conhecido, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, t-BOOH (peróxido de *terc*-butil) e paraquat, com uma substância antioxidante ou com outro composto de mecanismo desconhecido, e avaliar o efeito do tratamento da substância na modulação do estresse oxidativo (PICADA *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2006, 2007; DANI *et al.*, 2008).

Respostas adaptativas ao estresse oxidativo também podem ser encontradas em levedura. Células pré-tratadas com concentração sub-letal de um oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, t-BOOH, paraquat) apresentam indução de uma resposta protetora que permite que as mesmas sobrevivam a um tratamento com concentrações mais altas ou letais do oxidante (KUGE & JONES, 1994; IZAWA *et al.*, 1995; IZAWA *et al.*, 1996; GRANT *et al.*, 1998; BRENDDEL

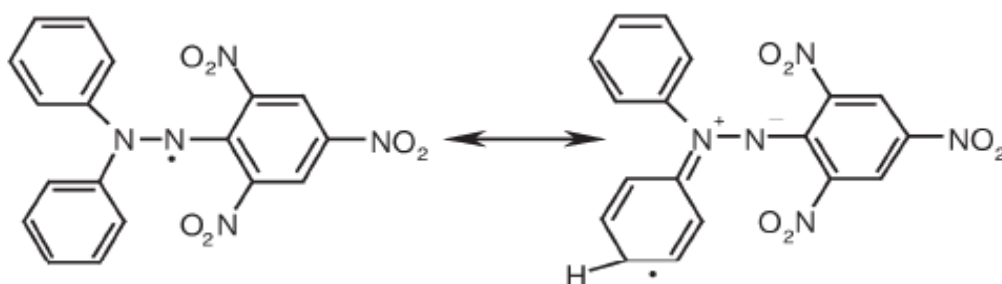
& HENRIQUES, 2001; HUANG *et al.*, 2003). Esta resposta adaptativa não é restrita ao estresse oxidativo, sendo que em levedura a resposta adaptativa mais conhecida é a do choque térmico. Respostas similares também ocorrem para o estresse osmótico, para agentes que provocam danos ao DNA e para outros tipos de estresse. O pré-tratamento com um tipo de agente estressor pode também induzir resistência cruzada contra outro tipo de agente estressor (PARK *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SUGIYAMA *et al.*, 2000). Esses estudos demonstram a complexidade de sistemas altamente regulados que evitam os danos celulares. A regulação desses sistemas em leveduras pode ser mais complexa do que daqueles de organismos aeróbios, pois a levedura é um aeróbio facultativo (MARIS *et al.*, 2001; BRENDEL & HENRIQUES, 2001; FERNANDES *et al.*, 2007).

Maris *et al.* (2000) demonstraram que a capacidade antioxidante das leveduras em crescimento fermentativo está bastante diminuída em relação a leveduras que não fermentam e que esta diferença não depende da função mitocondrial, ou seja, que o sistema antioxidante da levedura está sujeito à repressão por glicose, também conhecida por repressão catabólica.

Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que uma exposição prévia ao peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menadiona (gerador de superóxido) aumentam a resistência a níveis anteriormente tóxicos destes compostos, através da indução de genes e proteínas (ROSA *et al.*, 2006, 2007). Recentemente, foi proposta a existência de dois regulons paralelos de resposta a estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que seriam controlados pelos fatores de transcrição Yap1 e Skn7, envolvendo a indução de mais de 30 proteínas (LEE *et al.*, 1999; EL-BAYOUMY, 2005). Os genes controlados por Yap1 codificam produtos essenciais na manutenção do estado redox da célula.

Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae*, tanto proficientes como deficientes em sistemas de reparação de danos causados por estresse oxidativo, assumem um importante papel na verificação da capacidade oxidante e antioxidante, e na determinação do possível mecanismo de ação dos produtos testados.

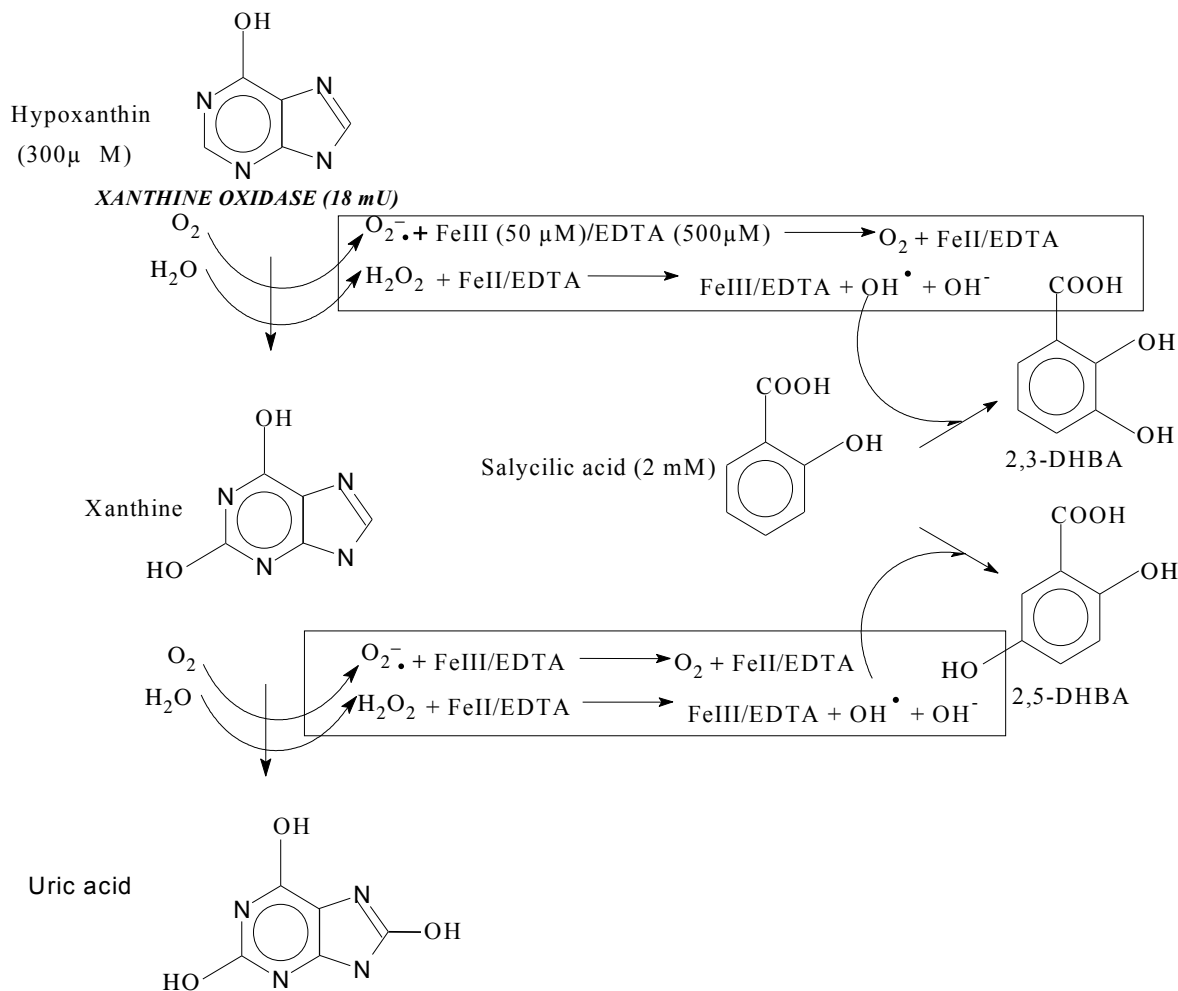
Um teste antioxidante *in vitro*, simples de se realizar, é a avaliação das propriedades antioxidantes de extratos ou compostos puros ou purificados, frente ao método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) (figura 9). O teste baseia-se na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o DPPH $\cdot$  provocando a varredura deste radical livre e modificando a coloração da solução. Os resultados obtidos frente ao método do radical livre DPPH permitem fazer uma comparação do potencial antioxidante entre o material a ser analisado em relação a um padrão (SOARES *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004).



**Figura 9:** Estrutura do radical livre DPPH.

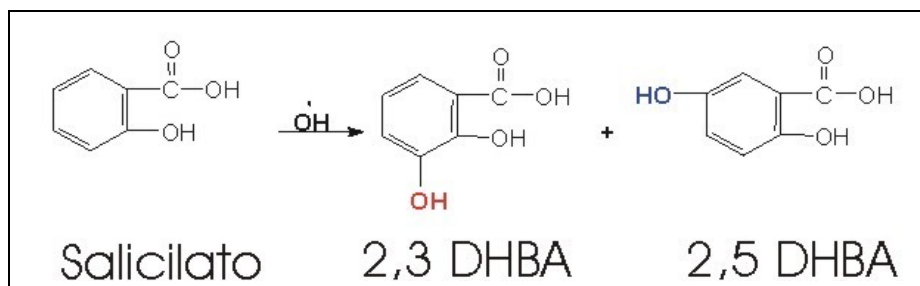
Outro tipo de teste antioxidante *in vitro* é o ensaio à base da xantina oxidase (figura 10). Durante o processo de hidroxilação da hipoxantina em xantina e depois em ácido úrico (devido à presença da enzima xantina oxidase) são produzidos também o íon superóxido a partir do oxigênio e peróxido de hidrogênio a partir de água. Na presença de Fe (III) e de EDTA, o íon superóxido é oxidado a oxigênio molecular, o que reduz o Fe (III) em Fe (II). O Fe (II) é necessária para a transformação, numa segunda reação, do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxilas. Como radicais hidroxilas são muito reativas, a metodologia para quantificação dos radicais hidroxilas produzidos no teste é baseada na reação de derivatização dos radicais hidroxilas com o ácido salicílico. Desta maneira, são formados dois compostos estáveis: 2,3 e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-

DHBA) (Figura 11), fáceis de serem medidos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OWEN *et al.*, 1996 e 2000).



**Figura 10:** Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes *in vitro* utilizando o sistema da xantina oxidase (OWEN *et al.*, 1996).





**Figura 11:** Derivatização dos radicais hidroxila com o ácido salicílico, levando a formação de dois compostos estáveis 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5 DHBA).

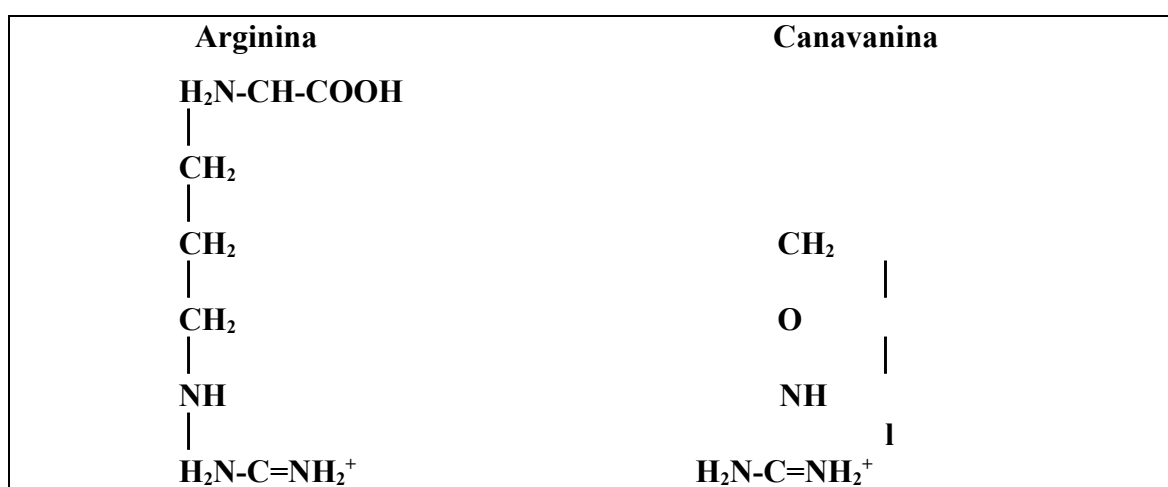
### 5.3 Teste de mutação *forward*

Os ensaios com levedura têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (TERZIYSKA *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2007). As mutações são detectadas através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA, podendo assim ser divididas em dois grupos: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (WATERS *et al.*, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2000; DEARFIELD *et al.*, 2002).

Alterações gênicas, resultantes de um tratamento mutagênico, podem ser facilmente quantificadas usando-se um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Muitas linhagens selvagens expressam um transportador de arginina chamado Can1p. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina (figura 12). O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina do ambiente levando as células à morte. Neste sentido, alterações no gene *CAN1*, induzidas por drogas

mutagênicas podem aumentar a sobrevivência das células em presença de canavanina quando comparadas a tratamentos não mutagênicos (BRENDDEL & HENRIQUES, 2001; HUANG *et al.*, 2003).

A linhagem N123 de *S. cerevisiae* permite a detecção deste tipo de mutação, chamada mutação *forward* (REVERS *et al.*, 2002). As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo na presença de canavanina.



**Figura 12.** Estrutura química dos análogos arginina e canavanina.

## 6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Desde a antiguidade, o homem tem utilizado as plantas como fonte para a elaboração de medicamentos com fins profiláticos e curativos de infecções (ROESLER *et al.*, 2001). Contudo, os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas são recentes, tendo início na década de 1940, após a descoberta da penicilina (SINI *et al.*, 2002). Devido aos crescentes problemas associados aos antimicrobianos, como a resistência microbiana aos fármacos tradicionais, e considerando-se o limitado espectro de ação e efeitos colaterais destes medicamentos, entre outros fatores, os estudos de substâncias oriundas de plantas adquiriram novas perspectivas, pelo fato de possuírem alto percentual de diversidade de estruturas, essencial para a descoberta e produção de novos

fármacos seguros, estáveis e eficazes pela indústria farmacêutica (LETIZIA *et al.*, 2003; RÍOS & RECIO, 2005; MENDEL & YAUDIM, 2007)

Agentes antimicrobianos, incluindo preservativos de alimentos e ácidos orgânicos, têm sido usados como inibidores de bactérias de alimentos e estendendo a vida útil de alimentos processados. Muitos compostos ocorrem naturalmente em plantas comestíveis e medicinais, ervas e temperos e tem apresentado funções antimicrobianas, podendo servir como fonte de agentes antimicrobianos contra patógenos de alimentos. Compostos fenólicos e suas subclasses, tais como cumarinas, flavonóides tem funções antimicrobianas (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

A suscetibilidade dos microrganismos a determinado extrato depende das propriedades, como sua composição química e suas concentrações, bem como dos microrganismos utilizados (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Na composição de um extrato existem compostos que apresentam maior atividade antimicrobiana, sendo que a mistura de dois ou mais compostos em quantidades adequadas, podem apresentar atividade antimicrobiana sobre as bactérias mais resistentes (ALTMAN, 1989; LAMBERT *et al.*, 2001). Os componentes hidrofóbicos de um extrato essencial antibacteriano pode impedir o contato com as células bacteriológicas hidrofílicas em crescimento localizado em outras regiões do alimento (BAGAMBOULA *et al.*, 2004).

No Brasil um grande número de plantas medicinais tem atividade antimicrobiana, uma vez que plantas medicinais são utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento. Além disso, nosso país apresenta uma rica biodiversidade, devendo-se considerar o custo mais baixo destas formas terapêuticas em relação aos medicamentos industrializados (VICENTINO & MENEZES, 2007). Para investigar esta atividade antimicrobiana de bactérias gram-positiva e negativa, o método da difusão do disco é um dos mais empregados, pois o ensaio se baseia no uso de discos como reservatórios contendo soluções dos extratos das plantas a serem avaliados e após a incubação é estabelecida a sensibilidade do microorganismo (NASCIMETO *et al.*, 2000; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2004).

## **II – OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GERAL**

Testar a atividade biológica do extrato etanólico das flores de *Hibiscus tiliaceus* L *in vitro* e *in vivo*.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar as extrações das flores da planta com etanol/água pelo método de ultrassom;
- Efetuar doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos totais presentes no extrato;
- Testar a atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* do extrato;
- Testar a atividade mutagênica e antimutagênica do extrato;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato;
- Correlacionar às atividades biológicas encontradas com os compostos identificados no extrato;

### **III – CAPÍTULO I**

**Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of  
the genus *Hibiscus*.**

**(Aceito para publicação na Food Chemistry)**

**doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.005**

**Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*.**

Elemar Gomes Maganha<sup>1</sup>, Rafael da Costa Halmenschlager<sup>2</sup>, Renato Moreira Rosa<sup>1</sup>, João Antonio Pegas Henriques<sup>1,2</sup> Ana Lúcia Lia de Paula Ramos<sup>2</sup> and Jenifer Saffi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Corresponding author. Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas - RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774; fax: +55 51 33167003.

E-mail address: [jenifer.saffi@ulbra.br](mailto:jenifer.saffi@ulbra.br) (J.Saffi)

## **Abstract**

The scientific basis for the statement that plants and their active constituents play an important role in the prevention of chronic and degenerative diseases is continuously advancing. In fact, the origin of many therapeutic substances is due to plant secondary metabolism. The genus *Hibiscus* contains 220 species distributed around the world. It is an interesting source of potential bioactive molecules, as phenolic compounds, triterpene derivatives, phytosteroids, with antioxidant, cardioprotective, antihypertensive and antiproliferative activities. This work reviews the pharmacological evidences of extracts of plants from the genus *Hibiscus*, giving an overview of the most studied biological effects and the known phytochemical composition. Although more studies are necessary, *Hibiscus* spp. exhibits proven potential to become an important pharmacological interest.

**Keywords:** *Hibiscus*; phytotherapies; antioxidants; medicinal plants

## Introduction

In recent times, focus on plant research has increased all over the world and a large body of evidence has been collected to show the immense potential of medicinal plants used in traditional systems. Various medicinal plants have been identified and studied using modern scientific approaches. The results revealed the potential of medicinal plants in the field of pharmacology (Tapsell *et al.*, 2006; Triggiani *et al.*, 2006).

Several human disease states, either related or chronic such as diabetes, neurodegenerative, cardiovascular diseases and specially carcinogenesis have been associated with oxidative stress. This condition occurs in a cell or in a tissue when the concentration of the reactive oxygen species (ROS) generated exceeds its antioxidant capability (Valko, Izakovic, Mazur, Rhodes, & Telser, 2004; Nakabeppu, Sakumi, Sakamoto, Tsuchimoto, Tsuzuki, & Nakatsu, 2006). As a consequence, much attention has been directed to the research of naturally occurring protective antioxidants and on their action mechanisms. In line with this, several plant extracts or their secondary metabolites have been found to show strong antioxidant activity and to protect against oxidant-induced damage (Triggiani, *et al.*, 2006; Collins, 2005; Loo, 2003). Accordingly, many plant extracts have demonstrated potent cancer chemopreventive properties as observed in the last decade (Ames, 1998a; Beckman, & Ames, 1998). Most of these extracts are known to exert their effects by antioxidant mechanisms that either quench reactive oxygen species (ROS), inhibit lipid peroxidation or stimulate cellular antioxidant defenses (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007; Yun, Ryoo, Lee, Park, Choung, & Yoo, 1999).

Natural products extracted from plants which belong to the Malvaceae family are used in the treatment of many diseases worldwide. One important genus in this family is *Hibiscus* spp., with more than 220 species distributed in tropical and subtropical regions (Tseng, & Lee, 2006). Species of the genus *Hibiscus* have been used in several applications in traditional medicine, as antidotes to poisoning with chemicals and venomous mushrooms and as a source of fiber in the pulp and paper industries, for example. Members of the genus *Hibiscus* thrive in a variety of climates and produce a



diversity of natural compounds with interesting bioactive properties (Holser, Bost, & Van Boven, 2004). Pharmacological investigations of the genus *Hibiscus* indicated the presence of some species with useful biological activities, as antihypertensive, anti-inflammatory, antipyretic, hepatoprotective, anti-diarrheic, anti-spermatogenic, anti-tumor, antidiabetic, anticonvulsivant, antihelminthic immunomodulator, antioxidant and antimutagenic agents (Dafallah, & Al-Mustafa, 1996; Sachdewa, & Khemani, 2003). Among these species, less than 15 have had their biological effects studied. The majority of these studies are mainly concentrated on *Hibiscus sabdariffa*. In this paper, we revised the phytochemical composition and the main pharmacological effects of the genus *Hibiscus*.

### ***Hibiscus syriacus***

*H. syriacus*, the common garden Hibiscus, is called rose of Sharon in North America, a name given also to other plants. It is a flowering shrub native of Asia. The root bark of *H. syriacus* L. has been used as an antipyretic, antihelmintic, and antifungal agent in the East. From the stem and root bark of *H. syriacus*, saponarin, polyphenol compounds, betulin, canthin-6-one, carotenoids and anthocyanins have been isolated previously (Chen, & Fang, 1993; Kwon, Hong, Kim, & Ahn, 2003). In this species, a lignan named hibiscuside, (+)-pinoresinol 4-O-[beta-glucopyranosyl (1-2)-alpha-rhamnoside] and a known lignan syringaresinol were present in the root bark of this plant, together with two feruloyltyramines and three known isoflavonoids 6"-O-acetyldaidzin, 6"-O-acetylgenistin and 3-hydroxydaidzein. All compounds exhibited important antioxidant activity *in vitro* (Yoo, Yun, Lee, Ryoo, Choung, & Han, 1998). During screening for lipid peroxidation inhibitors, three naphthalene compounds: 2,7-dihydroxy-6-methyl-8-methoxy-1-naphthalenecarbaldehyde, 2-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dimethoxy-1-naphthalenecarbaldehyde and 1-carboxy-2,8-dihydroxy-6-methyl-7-methoxynaphthalenecarbolactone (1->8), designed as syriacusins A-C, were isolated from the chloroform extract of the root bark of this plant (Yoo et al., 1998). Recently, in investigations for biologically active substances, two pentacyclic triterpene caffeic acid esters were isolated (**Figure 1**), increasing the number of molecules with potential pharmacodynamic interest concerning this species, since these molecules inhibited the lipid peroxidation in rat liver microsomes, indicating the existence of an antioxidant potential (Yun *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2003;

Yoo *et al.*, 2006). In the investigation of methanolic extract of root bark, 8-hydroxy-5,6,7-trimethoxycoumarin, a coumarin derivative molecule, scopoletin and clemicosins A, C and D were identified (**Figure 1**). The molecules with the coumarin core inhibited monoamine oxidase in vitro in a dose dependent manner, while the coumarin derivative and clemicosin were potent antioxidative agents in vitro (Yun, Lee, Ryoo, & Yoo, 2006).

More recently, the antiproliferative effect of acetone extract of the root bark of *H. syriacus* was reported on human lung cancer cells in culture and using in vivo models, employing A549-xenograft. In this study, it was shown that this extract suppresses the expression of the proto-oncogene p53 and of the apoptosis initiation factor- AIF-, which can explain the cytotoxic effect of this extract, although the exact mechanisms and the molecules which act in these effects remain unclear (Cheng, Lee, Harn,, Huang, & Chang, 2008).

### ***Hibiscus cannabinus***

*H. cannabinus*, known as kenaf, is an annual dicotyledonous herbaceous plant, well known in Asia and Africa, which has been cultivated in some Mediterranean areas. Kenaf has a long history of cultivation for its fiber by pulp and paper industries in India, Bangladesh, Thailand, parts of Africa and to a small extent in southeastern Europe (Pappas, Tarantilis, & Polissiou, 2003; Moujir, Seca, Silva, Lopez, Padilla, Cavaleiro, & Neto, 2007).

In previous phytochemical investigations, the aliphatic composition of the bark and core were reported, apart from the identification of new lignans isolated from the core and the isolation and structural characterization of new lignanamides, named grossamide K 1 and erythrocanabisine H 2, and of the 2,5-dimethyl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylnaphthol 3, as well as six other compounds from the acetone extract of bark of kenaf (Seca, Silva, Silvestre, Cavaleiro, Domingues, & Pascoal-Neto, 2001a; and 2001b). In contrast, the only previous report on the leaf volatile constituents of *H. cannabinus* concerns a biotype collected in Egypt. The authors mention the presence of 10 components, namely ethyl alcohol, isobutyl alcohol, limonene, phellandrene, R-terpenyl acetate, citral, and four

unidentified components. In line with this, a group investigated the chemical composition of this essential oil: fifty-eight components were characterized from *H. cannabinus* with (*E*)-phytol (28.16%), (*Z*)- phytol (8.02%), *n*-nonanal (5.70%), benzene acetaldehyde (4.39%), (*E*)-2-hexenal (3.10%), and 5-methylfurfural (3.00%) as the major constituents and for which antibacterial activity was detected (Kobaisy, Tellez, Webber, Dayan, Schrader, & Wedge, 2001). Recently, six lignans isolated from the core and bark acetone extracts of this plant and two compounds showed strong activity against three tumoral cell lines in several stages of cellular division (Moujir *et al.*, 2007).

### ***Hibiscus taiwanensis***

*H. taiwanensis* Hu is a moderate shrub widely distributed throughout Taiwan (Wu, Wu, He, Su, & Lee, 2005). Three new phenylpropanoid esters: (7*S*,8*S*)-demethylcarolignan E, hibiscuwanin A, hibiscuwanin B and eight known phenylpropanoids: threo-carolignan E, erythro-carolignan E, cleomiscosin A, cleomiscosin C, 9,9'-*O*-feruloyl(-)-secoisolariciresinol, dihydrodehydrodiconifenyl alcohol, boehmenan and ( $\beta$ )-syringaresinol have been isolated from this species (Wu *et al.*, 2005). In the cytotoxicity evaluation of these phenyl propanoids, 9,90-*O*-feruloyl-( $\beta$ )-secoisolaricinresinol (**Figure 2**) showed strong cytotoxic activity against human lung carcinoma and breast carcinoma cell lines in *in vitro* assays (Wu, Chuang, He, & Wu, 2004). Moreover, the crude methanolic extract has a promising cytotoxic activity against gastric and nasopharyngeal carcinoma cell lines. In addition, five new compounds, named as hibisculide A, hibisculide B, hibisculide C, hibiscutaiwanin, hibiscusin and fifty-one known compounds have been isolated from the stem of this species. Among them, mansonone H and uncarinic acid A inhibited HIV replication in H9 lymphocyte cells and myriceric acid C and uncarinic acid A showed cytotoxic activity against human lung carcinoma and breast carcinoma (Wu *et al.*, 2004).

### ***Hibiscus macranthus***

*H. macranthus* is a herbaceous plant widely distributed in tropical area of Africa. In the western province of Cameroon, the aqueous extract from their leaf mixtures is used by

tradipractioners to treat dysmenorrhoea and some cases of infertility in women and in sexual weaknesses in men. Indeed, the aqueous extract from the fresh leaves was shown to increase testosterone in adult male rat (Telefo, Moundipa, & Tchouanguép, 2002; Telefo, Moundipa, & Tchouanguép, 2004). Subsequently, a study evidenced the abundant presence of spermatozoa in the lumen of seminiferous tubules in rats, suggesting a useful potential of this plant in the treatment of cases of infertility due to oligospermia (Moundipa, Kamtchouing, Koueta, Tanchou, Foyang, & Mbiapo, 1999). Recently, Moundipa and co-workers showed that the dichloromethane and methanol extracts induced an increase in testosterone production by testes slices in vitro. However, further studies will be necessary for the isolation of androgenic bioactive components of this plant (Moundipa, Beboy, Zelefack, Ngouela, Tsamo, Schill, & Monsees, 2005; Moundipa, Ngouela, Kamtchouing, Tsamo, Tchouanguép, & Carreau, 2006).

### ***Hibiscus esculentus***

*H. esculentus* L., known as lady's finger, is very poorly studied species. The biological activity investigated in this species was the in vitro antioxidant potential and the major antioxidant molecules were identified to be quercetin derivatives and (-)-epigallocatechin (Shui, & Peng, 2004).

### ***Hibiscus vitifolius***

*H. vitifolius* Linn is a well-adapted species in the United States of America. A new flavonol bioside from its flowers was found to exhibit significant hypoglycemic activity (Kunnumakkara, Nair, Ahn, Pandey, Yi, Liu, & Aggarwal, 2007).

### ***Hibiscus abelmoschus***

The aqueous extract of the roots of *H. abelmoschus* L. has larvicidal activity against the larvae of mosquitoes of the genera *Anopheles* and *Culex* (Dua, Pandey, Alam, & Dash, 2006). This is a useful approach to prophylaxis in countries with high incidence of diseases transmitted by these vectors.

## ***Hibiscus tiliaceus***

*Hibiscus tiliaceus* L. is a common coastal plant native to Eastern and Northern Australia, Oceania and South-East Asia. The plant is also introduced as feral species in several parts of the world including South-Western Australia and in Southern Africa. It is known by many names including hau (Hawaiian), purau (Tahitian) and “algodoeiro da praia” (Brazil) (Rosa *et al.*, 2006). Their flowers are widely used in birth control in Asian and African countries (Brondegaard, 1973). An infusion of the dried wood has been used in folk medicine to expel the placenta and to combat postparturition disorders (Kobayashi, 1976). An aqueous extract of wood and fresh flowers has been reported to be useful to treat skin diseases (Singh, Ikahihifo, Panuve, & Slatter, 1884; Whistler, 1985). However, its chemical composition and biological and pharmacological effects are still poorly defined. Our research group has studied the biological activities of *H. tiliaceus* methanolic extract, with focus placed on antioxidant and antimutagenic effects. In a first work, a methanolic extract of *H. tiliaceus* flowers was studied to determine its *in vivo* antioxidant activity using *Saccharomyces cerevisiae* strains defective in antioxidant defense and exposed to oxidative stress induced by hydrogen peroxide and tert-butylhydroperoxide. The antioxidant effect verified was attributed to vitamin E and several derivatives of stigmasterol, which were identified in this extract (Rosa *et al.*, 2006). Phytosterols such as stigmasterol, stigmastadienol, and stigmastadienone, present in this extract, are recognized as antioxidants and play a potential role in the chemoprevention of DNA damage in human cells induced by oxidative radicals (Wang, Wang, Lin, Chu, Chou, & Tseng, 2000).

Recently a new friedelane-type triterpene named 27-oic-3-oxo-28-friedelanoic acid and eight known triterpenoids involving five friedelane-type derivatives were isolated from the stem and bark of *H.tiliaceus* (Li, Huang, Sattler, Fu, Grabley, & Lin, 2006). The knowledge about phytochemical composition of the extracts has rapidly increased. Chen and co-workers found a new coumarin, hibiscusin and a new amide, hibiscusamide, together with eleven known compounds including vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid, syringic acid, p-hydroxybenzaldehyde, scopoletin, N- trans-feruloyltyramine, N-cis-feruloyltyramine, a mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, a mixture of beta-sitostenone

and stigmasta-4,22-dien-3-one in the stem wood of this plant (Chen, Huang, Duh, Chen, Wang, & Fang, 2006; Liu *et al.*, 2006).

### ***Hibiscus rosa-sinensis***

*H.rosa-sinensis* is a glabrous shrub widely cultivated in the tropics as an ornamental plant, since it presents several forms with varying flower colours. In South Asian traditional medicine, various parts of the plant are used in the preparation of a variety of foods (Gilani, Bashir, Janbaz, & Shah, 2005). The leaves are used as laxative, while the root is used in cough treatment and the flowers are considered as aphrodisiac, emollient, emmenagogue and used in bronchial catarrh, diarrhea and fertility control (Gilani et al 2005; Kasture, Chopde, & Deshmukh, 2000). Moreover, in India the herbal products in the market intended for hair growth include the extract of various parts of *H. rosa-sinensis* (Adhirajan, Ravi Kumar, Shanmugasundaram, & Babu, 2003).

The most ancient property studied in this species is the antifertility effect, since the benzene extract of the flowers was able to prevent pregnancy in rats (Kholkute, Mudgal, & 1977a; Kholkute, 1977b). Other studies also show that this extract affects male fertility (Singh, Singh, & Udupa, 1882).

It is well accepted that the leaves and flowers of *H. rosa-sinensis* exhibit hair growth promoting properties in vitro and in vivo, as well as anti-greying properties, suggesting that the leaf extract could be included as a constituent in hair growth formulations (Adhirajan et al., 2003). Indeed, pharmaceutical interest in *H rosa-sinensis* is focused on this property.

The investigations about pharmacological properties have shown interesting effects. The ethanolic extract and acetone insoluble fractions exhibited anticonvulsant activity in pentylenetetrazol- and maximum electroshock- induced convulsion models but failed to protect animals from strychnine- induced seizures. However, in lower doses these fractions produced signs of depression such as reduced locomotion and rearing, passivity,

prostration, decreased muscle strength and diminished response to touch and noise (Kasture *et al.*, 2000). This interesting finding suggests that the anticonvulsant action of the fractions is mediated by the chloride channel of GABA-benzodiazepine receptor complex, not by the chloride channel of glycine receptors.

The flowers of *H. rosa-sinensis*, have been reported in the ancient Indian medicinal literature with beneficial effects in heart diseases, mainly in ischemic disease (Gauthaman, Saleem, Thanislas, Prabhu, Krishnamoorthy, Devaraj, & Somasundaram, 2006). The mechanisms of the cardioprotective effect are controversial; in this respect, a study showed for the first time that the flowers extract could enhance myocardial endogenous antioxidants by an adaptative response, without producing any cytotoxic effects. Therefore, the protection against myocardial ischemic reperfusion injury in the treated rats is attributed to enhanced endogenous antioxidant activity of this plant extract (Gauthaman *et al.*, 2006).

In view of the traditional uses of *H. rosa-sinensis* in constipation and diarrhea, the crude extract of aerial parts and its subsequent fractions were tested on isolated intestinal preparations to provide a pharmacological basis for their use in the gut motility disorders. This study clearly shows the presence of two components (cholinomimetic and calcium antagonist) in the crude extract of aerial parts. The cholinomimetic activity is likely to play role as mild laxative and provided mechanistic basis for the possible use of the plant for constipation, while the calcium antagonistic activity provides pharmacological rationale for its use in diarrhea (Gilani *et al.*, 2005).

Studies have demonstrated the anti-diabetic activity of *H. rosa-sinensis* in rural population and similar results were obtained with the leaf extract after repeated dosing in hyperglycemic rats (Sachdewa, & Khemani, 1999; Sachdewa, Raina, Srivastava, & Khemani, 2001). In an elegant study using streptozotocin-induced diabetic rats, a comparable hypoglycemic effect was evidenced after 7 and 21 days of oral administration of extract or glibenclamide. Besides, the extract lowered the total cholesterol and serum triglycerides and increased the HDL-cholesterol to a higher extent as compared to glibenclamide. In this manner, the hypoglycemic activity of this extract is comparable to

that of glibenclamide but is not mediated through insulin release, increasing the potential use of this species for human health purposes (Sachdewa *et al.*, 2003).

There is a very important evidence of the anticancer action for this extract against the effect of benzoyl peroxide and ultraviolet radiation in mouse skin by means of antioxidant protection, decreasing the ornithine decarboxylase activity and thymidine incorporation in DNA. In this manner, *H. rosa-sinensis* extract exerts a protective effect against the tumor promotion stage of cancer development (Sharma, & Sultana, 2004a and 2004b).

Phytochemical studies revealed the presence of several chemicals, including flavonoids, flavonoid glycosides, hibiscetin, cyanidine, cyanidin glucosides, taraxeryl acetate,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, ergosterol, citric, tartaric and oxalic acids, cyclopropenoids and anthocyanin pigments (Sachdewa, & Khemani, 1999; Sachdewa *et al.*, 2003; Gilani *et al.*, 2005; Gauthaman *et al.*, 2006; Ajay, Chai, Mustafa, Gilani, & Mustafa, 2007).

### ***Hibiscus sabdariffa***

*H. sabdariffa* L., an attractive plant, believed to be native to Africa, is cultivated in tropical areas as Sudan, Eastern Taiwan, and in Thailand (Chang, Huang, Hsu, Yang, & Wang, 2005; Hirunpanich, Utaipat, Morales, Bunyaphatsara, Sato, Herunsalee, & Suthisisang, 2005; Lin, Chen, Kuo, & Wang, 2007). This is an annual herb that grows to 180 cm or more; stems are glabrous, while the lower leaves are ovate with the upper leaves being 3–5 palmately lobed. The flowers are axillary or in terminal racemes, the petals are white with reddish centre at the base of the staminal column, the calyx enlarges at maturity and the fruit is fleshy and bright red. It is known as roselle (English), l'Oiselle (French), spanish (Jamaica), karkade (Arabic), Krachiap daeng (in Thailand) and bissap (Wolof). The calyces are used to make cold and hot beverages in many of the world's tropical and sub-tropical countries. The average consumption of these beverages in Nigeria is 150–180 mg/kg per day. Calyces are used in the West Indies to colour and flavour rum



and the seeds have been used as an aphrodisiac coffee substitute apart from this, its fruits are edible too (Ali, Al, & Blunden, 2005).

Its red persistent calyx of its flowers is the major component which has a sour taste and is commonly consumed in preparation of cold and hot beverages and as food colorant. Recently, it has gained an important position in the local soft drink market and commercial preparations of *H. sabdariffa* extract (HSE) are currently marketed as supplements due to their perceived potential health benefits (Ali et al., 2005). It is claimed to be a Thai traditional medicine for kidney and urinary bladder stones. It is also used as an antibacterial, antifungal, hypocholesterolemic, antispasmodic a diuretic, uricosuric, mild laxative, antihypertensive substance, against inflammation, mutagenicity and as immune modulating (Ali, Salih, Mohamed, & Homeida, 1991; Dafallah, & Al-Mustafa, 1996; Chen, Hsu, Wang, Chiang, Yang, Kao, Ho, & Wang, 2003; Farombi, & Fakoya, 2005).

The calyx and flowers of roselle has been known to contain many chemical constituents such as alkaloids, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene, anisaldehyde, arachidic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid, glycinebetaine, trigonelline, anthocyanins as cyanidin-3-rutinoside, delphinidin, delphinidin-3-glucoxyloside (also known as hibiscin, the major anthocyanin in *Hibiscus sabdariffa* flowers, **Figure 4**), delphinidin-3-monoglucoside, cyaniding-3-monoglucoside, cyaniding-3-sambubioside, cyaniding-3,5-diglucoside; the flavonol glycosides hibiscetin-3-monoglucoside, gossypetin-3-glucoside, gossypetin-7-glucoside, gossypetin-8-glucoside and sabdaritrin; quercetin, protocatechuic acid, pectin, polysaccharides, mucopolysaccharides, stearic acid and wax (Hirunpanich *et al.*, 2005). In the seed oil, the presence of campasterol, stigmasterol, ergosterol,  $\beta$ -sitosterol and  $\alpha$ -spinasterol has been reported. The petals yielded 65% (dry weight) of mucilage, which on hydrolysis yielded galactose, galacturonic acid and rhamnose. These molecules are bioactive in several biological models and responsible by the pharmacological effects presented by the extracts of this species. Various antioxidant constituents are found in the calyx and flower petals of roselle, such as hibiscus anthocyanins, quercetin, ascorbic acid, steroid glycosides (such as  $\beta$ -sitosteroid glycoside) and protocatechuic acid (Tseng, Kao, Chu, Chou, Lin. Wu, & Wang, 1997). Furthermore, HSE contained polyphenolic acids

(1.7% dry weight), flavonoids (1.43% dry weight), and anthocyanins (2.5% dry weight) (Tsuda, Shiga, Ohshima, Kawakishi, & Osawa, 1996; Tsuda, Kato, & Osawa, 2000a).

Phenolic compounds are ubiquitous in vegetables, fruit and nuts, and several of them have been reported to be inhibitors of chemical carcinogenesis due to their antioxidant properties (Wattenberg, 1985; Stich, 1991). *Hibiscus* anthocyanins (HAs) (Kamei, Kojima, Hasegawa, Koide, Umeda, Yukawa, & Terabe, 2003) are water-soluble and among the most important groups of plant pigments, which significantly reduced oxidative stress induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat hepatocytes *in vitro* and *in vivo*, an important model for liver injury, significantly reduced the activities of the serum enzymes indicative of liver damage and ameliorate histological lesions (Wang *et al.*, 2000; Suboh, Bilto, & Aburjai, 2004; Chang, Huang, Huang, Ho, & Wang, 2006). Similar dosages of HAs were effective mitigating the toxicity induced by paracetamol in mice (Ali, Mousa, & El-Mougy, 2003).

Furthermore, anthocyanins not only possess antioxidant ability, but also mediate other physiological functions related to cancer suppression, which has roused increasing interest concerning the pharmaceutical function in these pigments (Pool-Zobel, Bub, Schroder, & Rechkemmer, 1999; Meiers, Kemeny, Weyand, Gastpar, Angerer, & Marko, 2001; Tsuda, Horio, & Osawa, 2000b; Kamei *et al.*, 2003). HAs have demonstrated anti-tumor effect in HL-60 cells. The molecular mechanism underlying this effect could be described as the induction of apoptosis via activation of the p38 MAP kinase that subsequently phosphorylates the target protein c-jun and trigger the signal to further activate the apoptotic protein cascades that contain Fas-mediated signaling. As an outcome to the events, cytochrome c releases from the mitochondria, leading to the cleavage of caspase-3 (Chang *et al.*, 2005). In view of this, HAs were considered the major components of the antitumoral effect of HSE in human gastric adenocarcinoma and in promyelocytic cells *in vitro*, reflecting the chemopreventive potential of HSE (Lin, Chen, Kuo, & Wang, 2007).

*Hibiscus* protocatechuic acid (PCA) (**Figure 3**) has been demonstrated to be an efficacious agent in inhibiting the carcinogenic action of various chemicals in different

tissues, such as diethylnitrosamine in the liver, 4-nitroquinoline-1-oxide in the oral cavity, azoxymethane in the colon, *N*-methyl-*N*-nitrosourea in glandular stomach tissue, and *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in the bladder, in murine models (Hirose, Tanaka, Kawamori, Ohnishi, Makita, Mori, Satoh, & Hara, 1995; Tanaka, Kojima, Kawamori, & Mori, 1995; Tseng, Hsu, Lo, Chu, Chou, Huang, & Wang, 1998). PCA also shows mild cytotoxicity to PC14 and MKN45 human tumor cell lines and induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells by means of the reduction of retinoblastoma protein phosphorylation and Bcl-2 expression (Tseng, Kao, Chu, Chou, Lin, & Wang, 2000). Thus, PCA possesses strong antioxidant and antitumor promotion effects and may play a role in dietary chemoprevention (Hirose *et al.*, 1995; Tseng *et al.*, 1998; Chewonarin, Kinouchi, Kataoka, Arimochi, Kuwahara, Vinitketkumnuen, & Ohnishi, 1999). In addition, it has been reported that the topical application of PCA inhibited the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate -induced tumor promotion in the skin of mice initiated with benzo[*a*]pireno. Moreover, it has strong potential in inhibiting LDL oxidation induced by copper or a nitric oxide donor, besides the protection against cytotoxicity and genotoxicity of tert-butylhydroperoxide in a primary culture of rat hepatocytes and in rat liver. This indicates that this antioxidative potential can be involved in the beneficial effects of HSE (Hirunpanich *et al.*, 2005). Furthermore, PCA also inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage (Lin, Hsieh, Chou, Wang, Cheng, & Tseng, 2003).

Due to its chemical composition, HSE presents antioxidative potential and useful pharmacodynamic actions in diseases caused by oxidative stress, as cancer and cardiovascular pathologies. *In vitro*, the ethyl acetate fraction of the ethanol extract showed strong ability to scavenge free radicals in the assay of quenching the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, whereas the chloroform fraction showed the strongest inhibitory effect in the assay of xantine oxidase inhibition. Both fractions presented strong antioxidant potential in the model of tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage in the primary cultures of rat hepatocytes. In addition, HSE exerts its hepatoprotective activity against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride exposure in rats with the participation, at least in part, of the antioxidant activity of protocatechuic acid and anthocyanins (Liu *et al.*, 2000; Tseng, Wang, Kao, & Chu, 1996). Besides, some antioxidants as L-ascorbic acid, vitamin E or garlic acid may play an important role in this

effect (Sheweita, El-Gabar, & Bastawy, 2001). Recently, the pretreatment of rats with HSE reduced significantly the hepatotoxicity of cadmium. The extract also protected the rats against cadmium-induced liver, prostate, and testis lipoperoxidation. In this manner, the antioxidant ability of the aqueous extract can be used in cadmium poisoning (Asagba, Adaikpoh, Kadiri, & Obi, 2007). Interestingly, HSE reduced the extent of cisplatin-induced sperm abnormality and enhanced sperm motility through its antioxidant capacity, increasing the activities of testicular antioxidant enzymes, showing a possible employment of this plant in the treatment of fertility disorders (Amin, & Hamza, 2006). In addition, the methanolic extracts of leaves of this species has radioprotective efficacy against gamma radiation-induced liver damage in rats by stimulating the increase in hepatic superoxide dismutase production.

Two fractions of the ethanolic extract the chloroform soluble fraction and ethyl acetate soluble fraction orally administered to mice simultaneously with intraperitoneal injection of ferrous chloride - ascorbic acid - ADP mixture reduced the formation of malondialdehyde content in rats and significantly inhibited the induction of micronucleated polychromatic erythrocytes by sodium arsenite showing that the antioxidant properties of this plant contribute to its antimutagenic potential (Farombi, & Fakoya, 2005). The ethanolic extract of this species was also effective in decreasing the mutagenicity induced by heterocyclic amines in the *Salmonella* microsome assay and inhibits the formation of colon cancer at the initiation stage. Recently, the aqueous, ethyl acetate and chloroform extracts of the leaves of this species inhibited the mutagenicity induced by 1-nitropyrene in HeLa cells in a dose- response manner and showed antiproliferative effect in these cells (Olvera, Casta, Rezendiz, Reynoso, Gonzalez, Elizondo, & Loarca, 2008).

The ancient use of *Hibiscus sabdariffa*, the best-studied species in this genus, is related to cardiovascular diseases (Ali, Al, Wabel, & Blunden, 2005; Ajay *et al.*, 2007). In this sense, several studies evaluated the anti-hypertensive effects of HSE in several biological models. The intravenous injection of HSE to anaesthetized cats and rats lowered the blood pressure in a dose-dependent manner, which was partially blocked by atropine and antihistamine H1 blockers though the sectioning of the left and right vagi nerves did not have a significant effect on the fall in mean arterial blood pressure (Adegunloye,

Omoniyi, Owolabi, Ajagbonna, Sofola, & Coker, 1996; Ali, Salih, Mohamed, & Homeida, 1991). Recent pharmacological reports have shown that HSE significantly reduced blood pressure in humans and in experimental animals; in addition, the chronic administration of HSE decreased blood pressure and reduced cardiac hypertrophy in the 2-kidney-1-clip (2K-1C) rat model of hypertension and inhibited vascular tone in isolated vascular preparations including the rat thoracic aorta (Adegunloye *et al.*, 1996; Onyenekwe, Ajani, Ameh, & Gamaniel, 1999; Ajay, Chai, Mustafa, Gilani, & Mustafa, 2007). However, the exact mechanisms responsible for these effects are not fully understood. In view of this, the possibility that HSE could produce a direct vasorelaxant effect was investigated: the methanolic extract of calyces induced a vasodilator effect in isolated aortas from spontaneously hypertensive rats via endothelium-dependent and –independent vasodilator pathways. The endothelium-dependent vasodilator component results from the activation of endothelium-derived nitric oxide/cGMP-relaxant pathway, whereas endothelium independent component could be due to inhibition of calcium influx (Ajay, Chai, Mustafa, Gilani, & Mustafa, 2007). Thus, these findings provided rational evidence to the traditional use of the plant as an antihypertensive agent.

The first single trial involved 54 patients with moderate essential hypertension and has reported that the daily consumption of an aqueous extract resulted in a decrease of about 11% in blood pressure 12 days after the beginning of the treatment. In this study, three days after cessation of the treatment, the blood pressure rose again by about 6-8% (Haji, Haji, & Tarkhani, 1999). In 2004, a clinical trial involving 39 patients that receiving HSE and 36 hypertensive patients that were treated with captopril shows that HSE was effective and safe in the reduction of blood pressure, the same way that captopril was (Herrera, Flores, Chavez, & Tortoriello, 2004). A recent study confirmed the antihypertensive effect using watery infusions, in which a natriuretic effect was also evidenced, in a randomized, controlled, and double-blind clinical trial. The results showed that the experimental treatment decreased blood pressure with therapeutic effectiveness of 65.12 % as well as tolerability and safety of 100 %. Under the experimental treatment, the serum chlorine level increased, the sodium level showed a tendency to decrease, while potassium level was not modified. The possible mechanism underlying this effect could be

the inhibition of angiotensin I converting enzyme, since its activity decreased in the plasma of treated patients.

Currently, the dried calyx extracts of this species are commercially prepared as health food products available in the form of granules and as tea, and are claimed to be diuretic, antihypertensive and mainly as hypolipidemic. However, the scientific data in respect of hypolipidemic efficacy of these extracts are relatively recent. In 1991, rats with hypercholesterolaemia were fed with HSE for 9 weeks and the treatment progressively lowered the different lipid fractions in plasma, heart, brain, kidney and liver. However, this treatment slightly raised the content of plasma phospholipids (El-Saadany, Sitohy, Laib, & El-Massry, 1991). In the study of Chen and co-workers, in 2003, the administration of HSE to rabbits fed cholesterol for 10 weeks reduced the serum levels of triglycerides, total cholesterol and LDL, and mitigated atherosclerosis in aorta. Moreover, it slightly decreased the susceptibility of LDL to oxidation induced by cuprum sulphate *ex vivo* and the rate of conjugated dienes. Since phytoconstituents compounds such as  $\beta$ -sitosterol and pectin have been reported to possess hypocholesterolemic effect *in vivo*, it may be speculated that the hypolipidemic effects are attributed to these compounds (Hirunpanich, Utaipat, Morales, Bunyaphatsara, Sato, Herunsale, & Suthisisang, 2006).

Many investigations highlight an additional role of polyphenolic acids, flavonoids, and anthocyanins, which may act as antioxidants or via other mechanisms, enhancing the cardioprotective actions (Rimm, & Stampfer, 2000; Hirunpanich, Utaipat, Morales, Bunyaphatsara, Sato, Herumale, & Suthisisang, 2006). This potent dose-dependent antioxidant effect in the protection of LDL oxidation induced by cupricum sulphate *in vitro* was demonstrated some years ago and stimulates the investigation of antioxidant effect *in vivo* as well as the determination of the active compounds and this correlation with the antiatherosclerotic effects (Hirunpanich *et al.*, 2005). In some previous studies, HAs and PCA showed remarkable antioxidative activity and are able to inhibit LDL oxidation and lipid peroxidation *in vitro* (Wang *et al.*, 2000). Therefore, dietary HSE may reduce the incidence of heart disease, such as atherosclerosis, through their antioxidant activity.

According to the oxidative hypothesis of atherosclerosis, LDL entrapped in the subendothelial space of lesion-prone arterial sites is slowly oxidized through the action of resident vascular cells. In this manner, oxidation of LDL in the arterial wall is thought to be a very important step in atherogenesis. In this respect, HSE inhibits oxidation of LDL in the arterial wall, thereby exerting an antiatherosclerotic action, as observed in histopathological and immunohistochemical analysis (Chen *et. al.*, 2003). It has been demonstrated that many antioxidants inhibit the development of atherosclerotic lesions in rabbits fed with high cholesterol diet through the prevention of LDL oxidation. In this manner, there is considerable interest in the cardioprotective potential of HSE in lowering the incidence of atherosclerosis and coronary heart disease.

Recently, new pharmacodynamic activities on this plant have been reported, as immunomodulatory effect of the ethanolic extracts of dried calyx in mouse (Falceve, Pal, Bawankule, & Khanuja, 2008) and anticandidal activity. Moreover, the extract of this plant inhibited the rat bladder and uterine contractility in a dose-dependent manner via a mechanism unrelated to local or remote autonomic receptors or calcium channels (Prasongwatana, Woottisin, Sriboonlue, & Kukorgvirivapan, 2008).

### **Concluding remarks**

The main biological findings and the known phytochemical composition of the *Hibiscus* genus are summarized in table1. The studies conducted until now have demonstrated that the plants of the *Hibiscus* genus have the potential to provide biologically active compounds that act as antioxidants, as well as cardioprotective, and that are able to deter the proliferation of malignant cells. Thus, the *Hibiscus* genus deserves additional evaluation as a provider of chemopreventive agents. Indeed, there is a current need for availability of new plant-derived bioactive molecules; thus *Hibiscus* sp. may be a great natural source for the development of new drugs and may provide a cost-effective mean of treating cancers and other diseases in the developing world.

## References

Adegunloye, B.J., Omoniyi, J.O., Owolabi, O.A., Ajagbonna, O.P., Sofola, A O., & Coker, H.A. (1996).Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 25, 227-235.

Adetutu, A., Odunola, A.O., Owoade, A.O., Adeleke, A.O., & Amuda O.S.(2004). Anticlastogenic effects of *Hibiscus sabdariffa* fruits against sodium arsenite-induced micronuclei formation in erythrocytes in mouse bone marrow. *Phytotherapy research: PTR*, 18, 862-866.

Adhirajan, N., Ravi Kumar, T., Shanmugasundaram, N., & Babu, M.(2003).*In vivo* and *in vitro* evaluation of hair growth potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 226-235.

Ajay, M., Chai, H.J., Mustafa A.M., Gilani A.H., & Mustafa M.R. (2007)..Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 15-388.

Ali, B.H., Al, Wabel, N., & Blunden, G. (2005).Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy Research: PTRP*, 19, 75-369.

Ali, B.H., Mousa, H.M., & El-Mougy, S.(2003).The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research: PTR*, 17, 56-65.

Ali, M.B., Salih, W.M., Mohamed, A.H., & Homeida, A.M.(1991).Investigation of the antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *Journal Ethnopharmacol*, 31, 57-249.



- Ames, B.N. (1998a). Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology Letters*, 102-103, 5-18.
- Ames, B.N., & Gold, L.S. (1998b). The prevention of cancer. *Drug Metabolism reviews*, 30, 201-224.
- Amin, A., & Hamza, A.A. (2006). Effects of Roselle and Ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian journal of Andrology*, 8, 595-607.
- Asagba, S.O., Adaikpoh, M.A., Kadiri, H., & Obi, F.O. (2007). Influence of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. petal on cadmium toxicity in rats. *Biological Trace Element Research*, 115, 47-57.
- Beckman, K.B.; & Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547-581.
- Borek, C. (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integral Cancer*, 3, 333-374.
- Brondegaard, V.J. (1973). Contraceptive plant drugs. *Planta Medica*, 23, 167-172.
- Cassady, J.M., Baird, W.M., & Chang, C.J. (1990). Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of natural products*, 53, 23-41.
- Chang, Y.C., Huang, K., Huang, A. C., Ho, Y.C., & Wang, C.J. (2006). *Hibiscus* anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and chemical toxicology*, 44, 73-1015.
- Chang, Y.C., Huang, H.P., Hsu, J.D., Yang, S.F., & Wang, C.J. (2005). *Hibiscus anthocyanins* rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205, 12-201.

Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Chiang, H.C., Yang, M.Y., Kao, E.S., Ho, Y.C., & Wang, C.J. (2003). *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5465-5472.

Chen, J.J., Huang, S.Y., Duh, C.Y., Chen, I.S., Wang, T.C., & Fang, H.Y. (2006). A new cytotoxic amide from the stem wood of *Hibiscus tiliaceus*. *Planta Medica*, 72, 935-938

Chen, R. T., & Fang, S. D. E. (1993). On the chemical constituents of cotton rose *Hibiscus*. *Traditional and Herbal*, 24, 227-229.

Cheng, Y.L., Lee, S.C., Harn, H.J., Huang, H.C., & Chang, W.L. (2008). The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells. *American Journal of Chinese Medicine*, 36, 171-184.

Chewonarin, T., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnuen, U., & Ohnishi, Y. (1999). Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b) pyridine in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 591-601.

Collins, A.R. (2005). Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 41, 1923-1953.

Dafallah, A.A., & Al-Mustafa Z. (1996). Investigation of the antiinflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 24, 263-269.

Dua, V.K., Pandey, A.C., Alam, M.E., & Dash, A.P. (2006). Larvicidal activity of *Hibiscus abelmoschus* Linn. (Malvaceae) against mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 148-155.

El-Saadany, S.S., Sitohy, M.Z., Labib, S.M., & El-Massry, R.A. (1991). Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Nahrung*, 35, 490-567.

Falceve, T.O., Pal, A., Bawankule, D.U., & Khanuja, S.P. (2008). Immunomodulatory effect of extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Family Malvaceae) in a mouse model. *Phytotherapy*, 22, 664-672.

Farombi, E.O., & Fakoya, A. (2005). Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 1118-1120.

Fiala, E.S., Reddy, B.S., & Weisburger, J.H. (1985). Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs. *Annual review of nutrition*, 5, 295-321.

Gauthaman, K.K., Saleem, M.T., Thanislas, P.T., Prabhu, V.V., Krishnamoorthy, K.K., Devaraj, N.S., & Somasundaram, J.S. (2006). Cardioprotective effect of the *Hibiscus rosa-sinensis* flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 32.

Gilani, A.H., Bashir, S., Janbaz, K.H., & Shah, A.J. (2005). Presence of cholinergic and calcium channel blocking activities explains the traditional use of *Hibiscus rosa-sinensis* in constipation and diarrhoea. *Journal Ethnopharmacology*, 102, 94-289.

Haji, F.M., Haji, & Tarkhani, A. (1999). The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal Ethnopharmacol*, 65, 225-231.

Hayatsu, H., Arimoto, S., & Negishi, T. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 202, 46-429.

Herrera-Arellano, A., Flores-Romero, S., Chavez-Soto, M.A., & Tortoriello, J. (2004). Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in

patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*, *11*, 82-375.

Hirose, Y., Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K., & Hara, A. (1995). Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, *16*, 2337-2376.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N., Bunyaphatsara, N., Sato, H., Herumale, A., & Suthisisang, C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacol*, *103*, 252-260.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyaphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., & Suthisisang, C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*, 60-252.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyaphatsara, N., Sato, H., Herunsalee, A., & Suthisisang, C. (2005). Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle) *in vitro* using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biology Pharma. Bull*, *28*, 477-481.

Holser, R.A., Bost, G., & Van Boven, M. (2004). Phytosterol composition of hybrid *Hibiscus* seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 2546-2548.

Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., & Terabe, K. (2003). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. *Cancer Investigation*, *13*, 586-590.

Kasture, V.S., Chopde, C.T., & Deshmukh, V.K. (2000). Anticonvulsive activity of *Albizia lebeck*, *Hibiscus rosa-sinesis* and *Butea monosperma* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, *71*, 65-75.

Kawamori T., Tanaka T., Kojima T., Suzui M., Ohnishi M., & Mori H. (1994). Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Japanese journal of cancer research*, 85, 686-691.

Kholkute, S.D. (1977b). Effect of *Hibiscus rosa-sinensis* on spermatogenesis and accessory reproductive organs in rats. *Planta Medica*, 31, 92-127.

Kholkute, S.D., Mudgal, V., & Udupa, K.N. (1977a). Studies on the ant fertility potentiality of Hibiscus. *Planta Medica*, 31, 35-39.

Kobaisy, M., Tellez, M.R., Webber, C.L., Dayan, F.E., Schrader, K.K., & Wedge, D.E. (2001). Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3768-3771.

Kobayashi, J. (1976). Early Hawaiian uses of medicinal plants in pregnancy and childbirth. *The Journal of Tropical Pediatrics and Environmental Child Health*, 22, 260-262.

Kunnumakkara, A.B., Nair, A.S., Ahn, K.S., Pandey, M.K., Yi, Z., Liu, M., & Aggarwal, B.B. (2007). Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. *Blood*, 12, 5091-5112.

Kwon, S.W., Hong, S.S., Kim, J.I., & Ahn, I.H. (2003). Antioxidant properties of heat-treated *Hibiscus syriacus*. *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja*, 1, 20-21.

Lee, M.J., Chou, F.P., Tseng, T.H., Hsieh, M.H., Lin, M.C., & Wang, C.J. (2002). Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2124-2130.

Li, L., Huang, X., Sattler, I., Fu, H., Grabley, S., & Lin, W. (2006). Structure elucidation of a new friedelane triterpene from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Magnetic Resonance Chemistry*, 44, 624-628.

Lin, H.H., Chen, J.H., Kuo, W.H., & Wang, C. (2007). Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cell through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chemico-biological Interactions*, 165, 59-75.

Lin, W.L., Hsieh, Y.J., Chou, F.P., Wang, C.J., Cheng, M.T., & Tseng, T.H. (2003). *Hibiscus protocatechuic* acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Archives of Toxicology*, 77, 35-42.

Liu, J.Y., Chen, C.C., Wang, W.H., Hsu, J.D., Yang, M.Y., & Wang, C.J. (2006). The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 43-336.

Loo, G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 64-73.

Meiers, S., Kemeny, M., Weyand, U., Gastpar, R., von Angerer, E., & Marko, D. (2001). The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 62-958.

Moujir, L., Seca, A.M., Silva, A. M., Lopez, M. R., Padilla, N., Cavaleiro, J. Á., & Neto, C. P. (2007). Cytotoxic activity of lignans from *Hibiscus cannabinus*. *Fitoterapia*, 78, 378-385.

Moundipa, F.P., Kamtchouing, P., Koueta, N., Tantchou, J., Foyang, N.P., & Mbiapo, F.T. (1999). Effects of aqueous extracts of *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* in mature rat testis function. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 9-133.

Moundipa, P.F., Beboy, N.S., Zelefack, F., Ngouela, S., Tsamo, E., Schill, W.B., & Monsees, T.K. (2005). Effects of *Basella alba* and *Hibiscus macranthus* extracts on testosterone production of adult rat and bull Leydig cells. *Asian journal of andrology* 7, 7-411.

Moundipa, P.F., Ngouela, S., Kamtchouing, P., Tsamo, E., Tchouanguép, F.M., & Carreau, S. (2006). Effects of extracts from *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* mixture on testosterone production in vitro in adult rat testes slices. *Asian journal of andrology*, 8, 4-111.

Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., & Nakatsu, Y. (2006). Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biological Chemistry*, 387, 9-373.

Olvera, G.V., Casta, T.E., Rezendiz R.I., Reynoso C.R., Gonzalez E., Elizondo G., & Loarca P.G. (2008). *Hibiscus sabdariffa* L. extracts inhibit the mutagenicity in microsuspension assay and the proliferation of HeLa cells. *Journal of food science*, 73, 75-81.

Onyenekwe, P.C., Ajani, E.O., Ameh, D.A., & Gamaniel, K.S. (1999). Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*, 17, 199-206.

Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., & Polissiou, M.G. (2003). Isolation and spectroscopic study of pectic substances from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Natural product research*, 17, 171-176.

Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Schroder, N., & Rechkemmer, G. (1999). Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *European Journal of Nutrition*, 38, 227-261.

Prasongwatana, V., Woottisin, S., Sriboonlue, P., & Kukorgvirivapan, V. (2008). Uricosuric effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in normal and renal-stone former subjects. *Journal Ethnopharmacol*, 5, 491-496.

Rimm, E.B., & Stampfer, M.J. (2000). Antioxidants for vascular disease. *The Medical Clinics of North America*, 84, 49-239.

Rosa, R.M., Melecchi, M.I., da Costa Halmenschlager, R., Abad, F.C., Simoni, C.R., Caramao, E.B., Henriques, J.A., Saffi, J., & de Paula Ramos, A.L. (2006). Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, -7324-7330.

Sachdewa, A., & Khemani, L.D. (1999). A preliminary investigation of the possible hypoglycemic activity of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 12, 6-222.

Sachdewa, A., & Khemani, L.D. (2003). Effect of *Hibiscus rosa-sinensis* ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 61-66.

Sachdewa, A., Raina, D., Srivastava, A. K., & Khemani, L.D. (2001). Effect of Aegle marmelos and *Hibiscus rosa sinensis* leaf extract on glucose tolerance in glucose induced hyperglycemic rats (Charles foster). *Journal of Environmental Biology*, 22, 7-53.

Seca, A.M., Silva, A.M., Silvestre, A.J., Cavaleiro, J.A., Domingues, F.M., & Pascoal-Neto, C. (2001a). Lignanamide and other phenolic constituents from the bark of kenaf *Hibiscus cannabinus*. *Phytochemistry*, 58, 23-1219.

Seca, A.M., Silva, A.M., Silvestre, A.J., Cavaleiro, J.A., Domingues, F.M., & Pascoal-Neto, C. (2001b). Phenolic constituents from the core of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Phytochemistry*, 56, 67-759.



Sharma, S., & Sultana, S. (2004a).Effect of *Hibiscus rosa-sinensis* extract on hyperproliferation and oxidative damage caused by benzoyl peroxide and ultraviolet radiations in mouse skin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95, 115-220.

Sharma, S., Khan, N., & Sultana, S. (2004b).Effect of *Onosma echioides* on DMBA/croton oil mediated carcinogenic response, hyperproliferation and oxidative damage in murine skin. *European Journal of Cancer Prevention*, 13, 40-53.

Sheweita, S.A., El-Gabar, M.A., & Bastawy, M. (2001).Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P450 system in the liver of male rats: role of antioxidants.*Toxicology*, 169, 83-92.

Shui, G., & Peng, L.L. (2004).An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn. *Journal of chromatography*, 1048, 17-24.

Singh, M.P., Singh, R.H., & Udupa, K.N. (1882).Anti-fertility activity of a benzene extract of *Hibiscus rosa-sinensis* flowers on female albino rats. *Planta Medica*, 44, 171-174.

Singh, Y.N., Ikahihifo, T., Panuve, M., & Slatter, C.(1884).Folk medicine in Tonga.A study of the use of herbal medicines for obstetric and gynaecological conditions and disorders. *Journal Ethnopharmacology*, 12, 301-305.

Stich,H.F.(1991).The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds.*Mutation Research*, 259, 307-331.

Suboh, S.M., Bilty, Y.Y., & Aburjai, T.A. (2004).Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research: PTR*, 18, 276-280.

Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., & Mori, H.(1995).Chemoprevention of carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin the combination.*Carcinogenesis*, 75, 1433-1475.

Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C.S., Sullivan, D.R., Fenech, M., Enry, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M., Williams, P.G., Fazio, V.A., & Inge, K.E. (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *The Medical Journal of Australia*, 185, S4-24.

Telefo, P.B., Moundipa, P.F., & Tchouanguep, F.M. (2002). Oestrogenicity and effect on hepatic metabolism of the aqueous extract of the leaf mixture of *Aloe buettneri*, *Dicliptera verticillata*, *Hibiscus macranthus* and *Justicia insularis*. *Fitoterapia*, 73, 466-472.

Telefo, P.B., Moundipa, P.F., & Tchouanguep, F.M. (2004). Inductive effect of the leaf mixture extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis*, *Dicliptera verticillata* and *Hibiscus macranthus* on *in vitro* production of estradiol. *Journal Ethnopharmacology*, 91, 195-225.

Triggiani, V., Resta, F., Guastamacchia, E., Sabba, C., Licchelli, B., Ghiyasaldin, S., & Tafaro, E. (2006). Role of antioxidants, essential fatty acids, carnitine, vitamins, phytochemicals and trace elements in the treatment of diabetes mellitus and its chronic complications. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 6, 77-93.

Tseng, T.H., & Lee, Y.J. (2006). Evaluation of natural and synthetic compounds from East Asiatic folk medicinal plants on the mediation of cancer. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6, 65-347.

Tseng, T.H., Hsu, J.D., Lo, M.H., Chu, C.Y., Chou, F.P., Huang, C.L., & Wang, C.J. (1998). Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters*, 126, 199-207.

Tseng, T.H., Kao, E.S., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.W., & Wang, C.J. (1997). Protective effects of dried flower extract of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 1159-1164.

Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L., & Wang, C.J. (2000). Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bel-2 expression. *Biochemical Pharmacology*, *60*, 307-315.

Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S., & Chu, H.Y. (1996). *Hibiscus anthocyanin* are potent antioxidants in human cells. *Chemico-Biological Interactions*, *101*, 137-145.

Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (2000a). The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors*, *13*, 122-133.

Tsuda, T., Kato, Y., & Osawa, T. (2000b). Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Letters*, *484*, 197-207.

Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996). Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology*, *52*, 1022-1033.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, *266*, 37-56.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & cell Biology*, *39*, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. (2006). *Chemico- Biological Interactions*, *160*, 1-40.

Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chou, F.P., & Tseng, T.H. (2000). Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 6-411.

Wattenberg, L.W. (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, 45, 1-8.

Whistler, W.A. (1985). Traditional and herbal medicine in Cook Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 13, 239-280.

Wu, P.L., Chuang, T.H., He, C.X., & Wu, T.S. (2004). Cytotoxicity of phenylpropanoid esters from the stems of *Hibiscus taiwanensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 2193-2200.

Wu, P.L., Wu, T.S., He, C.X., Su, C.H., & Lee, K.H. (2005). Constituents from the stems of *Hibiscus taiwanensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53, 47-56.

Yokota, M., Zenda, H., Kosuge, T., & Yamamoto, T. (1978). Studies on isolation of naturally occurring biologically active principles. V. Antifungal constituents in *Betulae cortex* (author's transl). *Yakugaku Zasshi*, 98, 1508.

Yoo, I.D., Yun, B.S., Lee, I.K., Ryoo, I.J., Choung, D.H., & Han, K.H. (1998). Three naphthalenes from root bark of *Hibiscus syriacus*. *Phytochemistry*, 47, 799-802.

Yoo, I.D., Yun, B.S., Lee, I.K., Ryoo, I.J., Choung, D.H., & Han, K.H. (1998). Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarins-lignans from *Hibiscus syriacus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 1238-1240.

Yun, B.S., Ryoo, I.J., Lee, I.K., Park, K.H., Choung, D.H., Han, K.H., & Yoo, I.D. (1999). Two bioactive pentacyclic triterpene esters from the root bark of *Hibiscus syriacus*. *Journal of Natural Products*, 62, 764-770.

## Legend for figures

Figure1. Some biological compounds of *H. syriacus*: (1) scopoletin; (2) clemiscosin A; (3) clemiscosin C; (4) clemiscosin D; (5) structure of pentacyclic triterpenes; (6) syriacusin A.

Figure2. The metabolite 9,9'-O-feruloyl(-)secoisolariciresinol, an cytotoxic compound from *H. taiwanensis*.

Figure 3. Structure of delphinidin-3-glucoxyloside (1), the major anthocyanin from *H. sabdariffa* flowers, and protocatechuic acid (PCA).

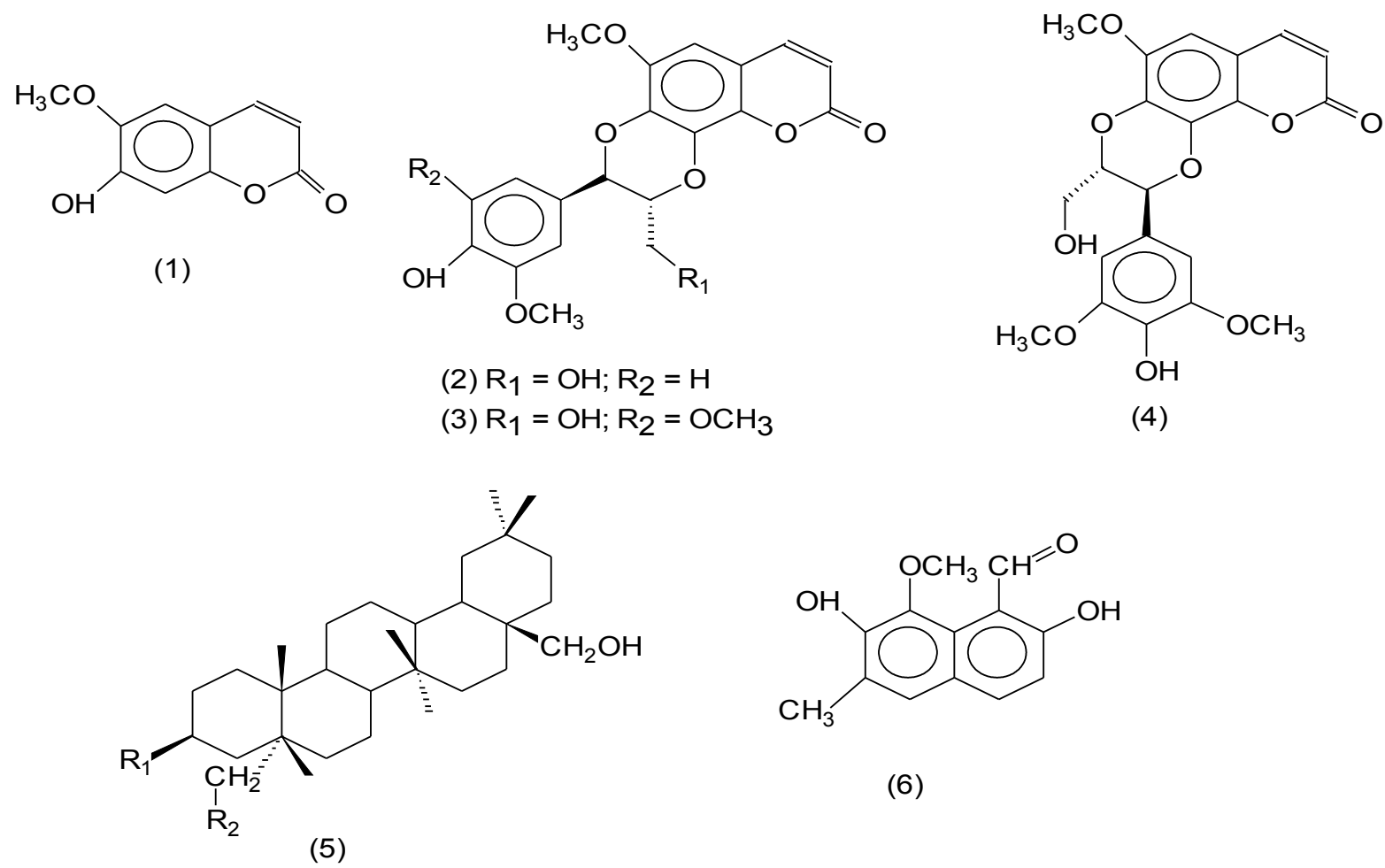


Fig.1

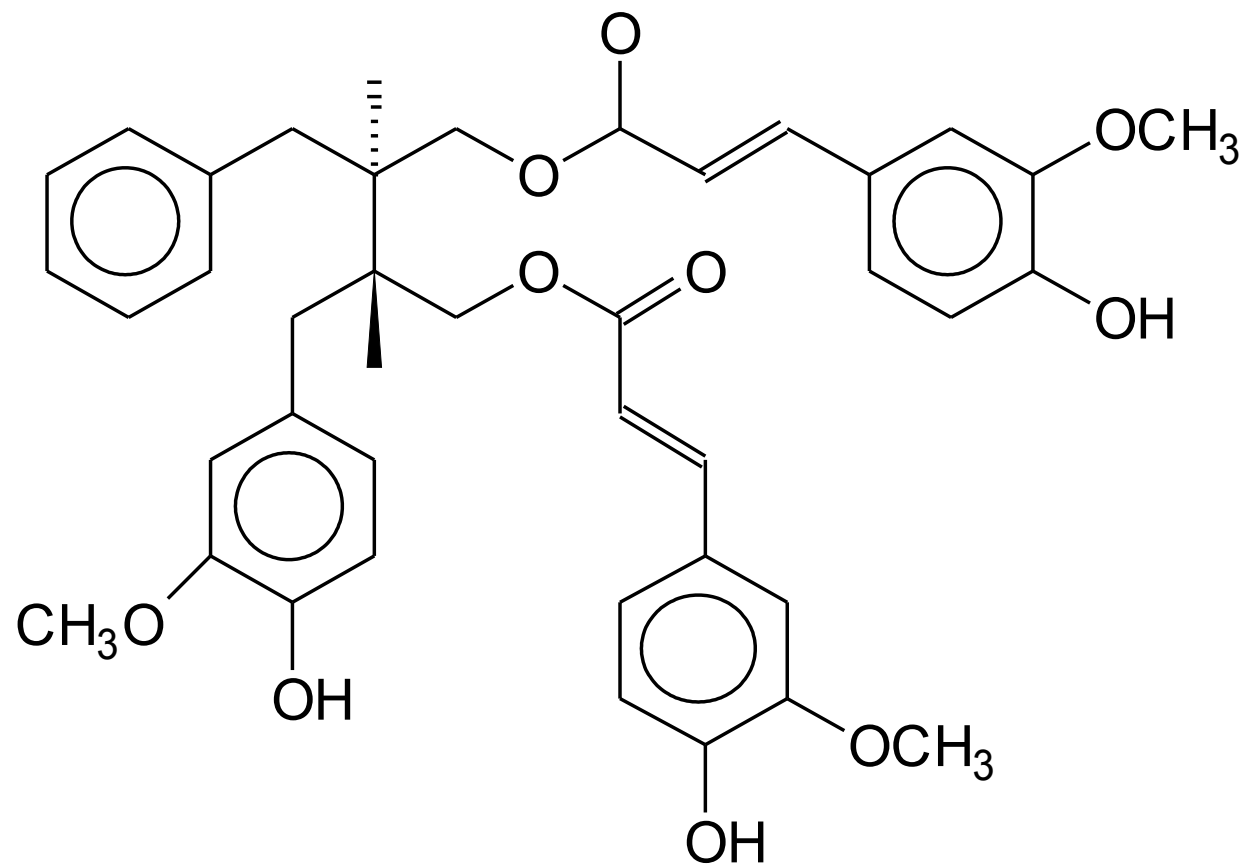
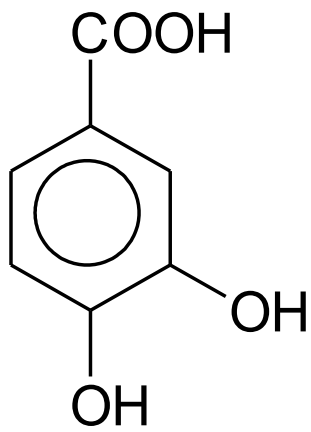
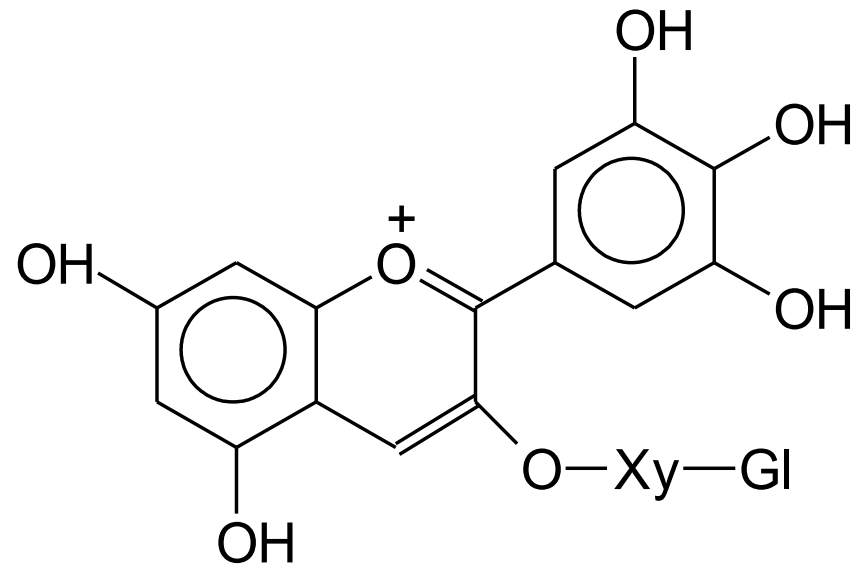


Fig.2



PCA



(1)

Xy: xylose

Gl: glucose

Fig.3



## TABLES

Table1. Some secondary metabolites found in the *Hibiscus* genus and its pharmacodynamic properties.

Species	Important compounds	Sources studied	Pharmacodynamic effects	References
<i>H. syriacus</i>	Hibiscuside Syringaresinol Feruloyltyramines Isoflavonoids Syracusins A-C Pentacyclic triterpene caffeic acid esters Clemicosin A, C and D Scopoletin 8-hydroxy-5,6,7-trimethoxycoumarin	Chloroform extract of root bark	Antioxidant in vitro Monoaminoxidase inhibitors	Yokota <i>et al.</i> , 1978; Kwon <i>et al.</i> , 2003; Yoo <i>et al.</i> , 1998; Yun <i>et al.</i> , 1999.
<i>H. cannabinus</i>	Grossamide K1 Erythrocanabisine H2 Phellandrene Phytol Nonanal 5-methyl-furfural 2-hexenal Benzene acetaldehyde	Leaf Acetone extract of root bark	Antibacterial	Pappas <i>et al.</i> , 2003; Moujir <i>et al.</i> , 2007; Seca <i>et al.</i> , 2001a; Seca <i>et al.</i> , 2001b.
<i>H. taiwanensis</i>	(7S,8S)-demethylcariolignan E Hibiscuwanin A Hibiscuwanin B Clemicosin A and C 9,9'-O-feruloyl(-) secoisolariciresinol Dehydroconifenyl alcohol	Methanol extract of leaf	Cytotoxic against tumoral cells in vitro Inhibited HIV replication Cytotoxic against human lung carcinoma	Wu <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005.

	$\beta$ -syringaresinol Erythro-cariolignan E Hibisculide A Hibisculide B Hibisculide C Hibiscutaiwanin Hibiscusin Mansonone H Uncarinic acid Mycevic acid		and breast carcinoma	
<i>H. macranta</i>		Aqueous extract of flowers	Androgenic effects	Moundipa <i>et al.</i> , 1999); Telefo <i>et al.</i> , 2004; Moundipa <i>et al.</i> , 2005; Moundipa <i>et al.</i> , 2006.
<i>H. esculentus</i>	(-)-epigallocatechin	Flowers	Antioxidant in vitro	Shui, & Peng, (2004).
<i>H. vitifolius</i>	Flavonol bioside	Flowers	Hypoglycemic activity	Kunnumakkar <i>et al.</i> , 2007.
<i>H. abelmoschus</i>		Aqueous extract of roots	Larvicidal activity	Dua <i>et al.</i> , 2006.
<i>H. tilliaceous</i>	Stigmasterol Stigmastadienol Stigmastadienone 27-oic-3-oxo-28-friedelanoic acid Vanillic acid Syringic acid Scopoletin N-trans-feruloyltiramine N-cis-feruloyltiramine $\beta$ -sitostenone Stigmasta-4,22-dien-3-one	Methanol extract of flowers and leaves	Antioxidant activity in vitro	Kobayashi, 1976; Singh <i>et al.</i> , 1884; Whistler, 1985.
<i>H. rosa sinensis</i>	Hibiscetin	Aqueous extract of	Anticonvulsivant action	Gilani <i>et al.</i> , 2005;

	<p>Cyanidin  Cyanidine glucosides  Taraxeryl acetate  <math>\beta</math>-sitosterol  Campesterol  Ergosterol  Cyclopropenoids</p>	flowers and leaves	<p>Cardioprotective effect  Cholinomimetic activity  Hypoglycemic effects  Antiproliferative effects  in tumor xenografts  vivo</p>	<p>Adhirajan <i>et al.</i>, 2003;  Kholkute, 1977b; Singh <i>et al.</i>, 1882; Gauthaman <i>et al.</i>, 2006; Sachdewa, &amp; Khemani, 1999; Sachdewa <i>et al.</i>, 2001; Sharma, &amp; Sultana, 2004a; Sharma <i>et al.</i>, 2004b; Ajay <i>et al.</i>, 2007.</p>
<i>H. sabdariffa</i>	<p><math>\beta</math>-carotene,  Anisaldehyde,  Arachidic acid,  Citric acid,  Malic acid,  Tartaric acid,  Glycinebetaine,  Trigonelline,  Anthocyanins  Cyanidin-3-rutinoside,  Delphinidin,  Delphinidin-3-glucoxyloside</p>	Aqueous extract of flowers, leaves and bark	<p>Aphrodisiac  antibacterial, antifungal,  hypocholesterolemic,  antispasmodic a  diuretic, uricosuric,  mild laxative,  antihypertensive  substance, against  inflammation,  mutagenicity and as  immune modulating</p>	<p>Dafallah, &amp; Al-Mustafa, 1996; Farombi, &amp; Fakoya, 2005; Chen, &amp; Fang, 1993; Ali <i>et al.</i>, 1991; Ali <i>et al.</i>, 2005; Osawa <i>et al.</i>, 1996; Kamei <i>et al.</i>, 2003; Chang <i>et al.</i>, 2006; Suboh <i>et al.</i>, 2004; Pool-Zobel <i>et al.</i>, 1999; Meiers <i>et al.</i>, 2001.</p>

## **IV-CAPÍTULO II**

**Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* biological activity of the ethanol extract of flowers of *Hibiscus tiliaceus* L.**

**(Submetido a Food and Chemical Toxicology)**

**Evaluation of the in vitro and in vivo biological activities of the ethanol extract of  
*Hibiscus tiliaceus* L. flowers**

Elemar Gomes Maganha <sup>1,2</sup>, Giovanni Cignachi <sup>2</sup>, Valéria Flores Peres<sup>1,2</sup>, Marc François Richter<sup>4</sup>, Maria Inês S. Melecchi<sup>3</sup>, Ana Lígia Lia de Paula Ramos<sup>3</sup>, Renato Moreira Rosa<sup>1,2</sup> and Jenifer Saffi<sup>1,2,3</sup> \*

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica e Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Farmacocinética, Centro de Pesquisa em Ciências Médicas, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

\* Corresponding author. Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas - RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774 ; fax: +55 51 33167003.

E-mail address: jenifer.saffi@ulbra.br (J.Saffi)

<sup>1</sup>Abbreviations

Abbreviations: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hydrogen peroxide; t-BHP, tert-butyl-hydroperoxide; DDPH, diphenylpicrylhydrazyl; HEE, ethanol extract of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers; 4-NQO - 4-nitroquinoline-oxide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DHBAs, dihydroxyphenol, 2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid; AA, antioxidant activity.

## **Abstract**

*Hibiscus tiliaceus* L., usually known as linden hibiscus, is a native species found in mangroves and along the coastline forests of Latin America. The plant is used in popular medicine as spermicide and contraceptive. So far, there has not been any study confirming the efficacy of the plant's flowers for therapeutic purposes. The results of the present study indicate that the ethanol extract of *Hibiscus tiliaceus* flowers presents significant *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity, protecting yeast strains against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. Apart from this, ethanol extract of *Hibiscus tiliaceus* is non-mutagenic and protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mutagenicity in *S. cerevisiae*. The percentage of total flavonoids, polyphenols and tannins found in the extract may be responsible, at least partly, for the antioxidant and antimutagenic actions it exhibits.

**Keywords:** *Hibiscus*, medicinal plants, *Hibiscus tiliaceus*, phytotherapies

## 1. Introduction

Human populations have for long utilized plant species as food and therapeutic agents to treat and cure diseases. In developing and underdeveloped countries, poverty and restricted access to modern medicine practice increases the populations' dependence on the empirical knowledge about medicinal plants concerning health care, since plants are often the only therapeutic resource in several of these communities. The therapeutic information gathered along centuries is used as a guideline for pharmacological research, which proves the importance of ethnopharmacology (Maciel *et al.*, 2002; Calixto *et al.*, 2005; Michelin *et al.*, 2005; Noldin *et al.*, 2006).

In recent times, the focus on plant research has increased all over the world and a large body of evidence has been collected to show the immense potential of medicinal plants used in traditional systems. Various medicinal plants have been identified and studied using modern scientific approaches. The results revealed the potential of medicinal plants in the area of pharmacology (Maciel *et al.*, 2002; Calixto *et al.*, 2005; Michelin *et al.*, 2005; Tapsell *et al.*, 2006; Triggiani *et al.*, 2006). The term 'chemoprevention' has been used to describe the prevention of cancer using specific agents to suppress or reverse the carcinogenic process (De Flora and Ferguson, 2005). In recent years attention has been focused on the anticancer properties of components of higher plants, an important role in the prevention of disease (Block, 1992; Lambert and Yang, 2003). Accordingly, many plant extracts have demonstrated potent cancer chemopreventive property, as observed in the last decade (Ames, 1998; Ames and Gold, 1998; Beckman and Ames, 1998). Most of these extracts are known to exert their effects by antioxidant mechanisms either quenching reactive oxygen species (ROS), inhibiting lipid peroxidation or stimulating cellular antioxidant defenses (Park and Pezzuto, 2002; Valko *et al.*, 2007).

In this context, the species belonging to the genus *Hibiscus* — used in popular medicine in China and in Eastern Asia in the treatment and prophylaxis of infections and inflammations — form a large group of medicinal plants acknowledged for their therapeutic uses. Such uses are based on these species' botanical and phytochemical characteristics and on the biological activities they exert. In this scenario, the *Hibiscus* genus has gained diverse applications, such as antidote to poisoning caused by chemicals

or as raw material in the pulp and paper industry. The species belonging to the genus thrive in several climate types, producing a diversity of natural compounds that present bioactive properties, such as naphthalene, polyphenols, carotenoids, tocopherols, flavonoids and anticyanines (Holser *et al.*, 2004).

*Hibiscus tiliaceus* is a typical plant of tropical climates found in the regions of mangroves in significant quantities (Rosa *et al.*, 2006). It is also known as "Algodoeiro da Praia" (beach cotton plant) and occurs in mangroves in Santa Catarina state, in the south of Brazil. The flowers are widely used in birth-control in Asian and African countries (Brondegaard, 1973; Kholkute and Udupa, 1977). To expel the placenta and to combat post-parturition disorders, an infusion of the dried wood was used in folk medicine (Kholkute and Udupa, 1977). An aqueous extract of wood and fresh flowers is registered for skin diseases and the aqueous extract of fresh *H. tiliaceus* wood and flowers is used to speed up bone fracture consolidation, as well as to treat skin diseases (Whistler, 1985; Holdsworth, 1991; Whister, 1995). Recently we demonstrated that the *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic flower extract exerts an antioxidant effect in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, protecting against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and tert-butyl-hydroperoxide (t-BHP) cytotoxicities (Rosa *et al.*, 2006).

The aim of the present study was to assess the *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity of the ethanol extract of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers, as well as its possible mutagenic/antimutagenic effects and establish a comparison with the properties of the methanolic extract, because the change in the polarity of the solvent is able to modify the constituents of the extract and consequently its biological effects. The sequestering capacity of hydroxyl radical was examined using the *in vitro* hypoxanthine/xanthine oxidase assay in the ethanol extract, and the antioxidant evaluation was conducted using the DPPH assay, which detects the ability of the extract to act as a donor of hydrogen atoms or of electrons in the reduced DPPH-H form (diphenylpicrylhydrazyl). The *in vivo* antioxidant activity was studied using strains of the *Saccharomyces cerevisiae* proficient and deficient in the superoxide dismutase enzyme while the haploid strain N123 was used in the investigation of the mutagenic and antimutagenic activities.



## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant material**

*Hibiscus tiliaceus* L. flowers were collected in the mangroves of the state of Santa Catarina, Brazil, in December 2006. The plant was identified by Dr. B. Irgand (Instituto de Biociências, UFRGS, RS, Brazil). A dried specimen (ICN: 113936) was deposited in the herbarium of UFRGS. Flowers were dried at 40°C, ground, and stored in dark bags to protect them from humidity and light.

### **2.2. Preparation of ethanol extracts**

Fifteen grams of dried and minced flowers were weighed and blended in an aqueous ethanol solution (1:1) continuously for 2 h in a ultra-son instrument. The extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator at 30 – 40 °C to obtain a semi-solid substrate. The viscous residue was obtained in a vacuum dissicator and conserved on phosphorus pentoxide for 24 h to produce a homogeneous and completely dry mass. This mass was named ethanol extract of *H. tiliaceus* L. flowers (HEE).

### **2.3. Chemical and reagents**

Yeast extract, Bacto-peptone and Bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO), hypoxanthine, xanthine oxidase and salicylic acid, aminoacids (L-histidine, L-threonine, L-metionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine), nitrogenated bases (adenine and uracil), L-canavanine, were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

### **2.4 Determination of total phenols (TP), total tannins (TT) and total flavonoids (TFO)**

The amount of total phenols in the ethanol extract was determined according to the Folin-Ciocalteus Phenol Reagent (Merck) according to the European Pharmacopoeia method for determination of tannins (Ph. Eur., 2005). Total tannins were complexed with hide-powder (Sigma) and unbound phenolics determined as above. Total tannins were

calculated by subtracting non-tannin phenolics from total phenolics. The amount of total flavonoids was determined as described in the German Pharmacopoeia (1996). In brief, the extract was treated with acetone containing diluted hydrochloric acid and methenamine under gentle heating in a water bath. After adding water (20 ml), the resulting solution was partitioned with ethyl acetate. The volume of the combined organic layers was adjusted to 50 ml by adding ethyl acetate. A 10 mL aliquot was treated with 2% (w/v) AlCl<sub>3</sub> solution in 5% (v/v) methanol acetic acid and filled up to 25mL with the same solvent. After 30-min incubation at room temperature, absorbance was recorded at 425 nm against a blank containing 10mL of ethyl acetate solution without AlCl<sub>3</sub> being added. The amount of total flavonoids was expressed as % (w/w) of dry extract, assuming that specific absorbance of quercetin is 500. All measurements were done in triplicate.

#### 2.5. Assays employing the yeast *S. cerevisiae*

The relevant genotypes of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work are given in Table 1. Media, solutions and buffers were prepared as previously described (Burke *et al.*, 2000). Complete medium YPD containing 0.5% yeast extract, 2% bacto-peptone and 2% glucose was used for routine growth of yeast cells. For plates, the medium has solidified with 2% bactoagar. The minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without aminoacids, 2% glucose and 2% bacto-agar was supplemented with the appropriate amino acids. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, 2 mg tryptophan per 100 mL. For the detection of mutagenesis in the strain N123, plates were supplemented with 60 µg/mL canavanine (SC+can). Stationary phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in liquid YPD. After 48h at 30°C with aeration by shaking, the cultures contained 1-2x10<sup>8</sup> cells/mL. Cell concentration and percentage of budding cells in each culture were determined by microscope counts using a Neubauer chamber.

For cells treatment, stock solutions of extract were prepared immediately prior to use. The HEE were first dissolved in distilled water and the treatments were performed at the concentrations 0.1-1 mg/mL at 30°C in the dark with agitation. The solvents controls

were include in the genetic tests as negative control; 4-NQO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as positive control.

### 2.5.1 Antioxidant Activity of the HEE

For the analysis of antioxidant activity, strains of *S. cerevisiae* proficient and deficient in superoxide dismutase enzymes (SOD, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*) were used. Cells in stationary phase were harvested by centrifugation and washed twice with saline solution. The cell density was determined using a Neubauer counting chamber. The extract was prepared in a concentration of 2 mg/mL in distilled water. For detection of a putative extract toxicity to yeast, a suspension containing 2 x 10<sup>8</sup> cells/mL was incubated with the extract at the concentrations 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/mL in saline solution for 1 h at 30°C with shaking in the dark. For the evaluation of the antioxidant effect of this extract, the cells were pre-incubated with the extract in these conditions and, subsequently, challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) for 1 h at 30°C in PBS buffer with agitation in the dark. After treatment, appropriate dilutions of cells were plated onto YPD plates to determine cell survival. Plates were incubated at 30°C for 48-72 h, after which time colonies were counted and compared to the negative control plates. Control plates were considered to represent 100% survival of the yeast cell. All tests were repeated at least times and plating was carried out in triplicate for each dose.

### 2.5.2 Detection of forward mutation and potential antimutagenic activity in *S. cerevisiae*

Strain N123 (Table 1) was used for this analysis because it is very responsive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced mutagenesis, since it shows low glutathione content (BRENDDEL *et al*, 1998). Yeast cells were cultured overnight in YPD medium at 30°C until the cell suspension reached a density of 1- 2 x 10<sup>7</sup> cells/ml. Cells were harvested and washed twice by centrifugation with 0.9% NaCl solution and submitted to several treatment routines: treatment only the HEE; pre-treatment with HEE during 1 h at 30°C in the dark with agitation, washing with buffer solution and afterwards exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS under the same conditions of temperature, agitation and luminosity; co-treatment with plant extract and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h at 30°C in the dark with agitation ; and treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 1

h at 30°C in the dark with agitation, washing of the cells with PBS and following exposition to the plant extracts under the same conditions of temperature, agitation and luminosity. Cell concentration and percentage of budding cells in each culture were determined by microscope counts using a Neubauer chamber. After treatment, appropriate dilutions of cells were plated onto SC plates to determine cell survival and 100 µL aliquots of cell suspension ( $1-2 \times 10^7$  cells/mL) were plated on to SC media supplemented with canavanine 60 µg/mL and incubated for 4-5 days at 30°C. Data represent the average of at least three experiments. Forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (CAN1-can1) after induction with different treatments. This assay uses a phenotypic marker, canavanine sensitivity, already wild type (WT) yeast strains express the arginine transporter Can1p, which also imports canavanine from the environment and leads to cell death (Whelan *et al.*, 1979). Thus, mutagen-induced alterations in the *CAN1* gene that impair Can1p functionality can increase cellular survival in the presence of canavanine when compared to a non-mutagenic cell sample.

## **2.6 *In vitro* antioxidant Assays**

### *2.6.1 Hypoxanthine/xanthine oxidase assay*

The method employed to assay the hydroxyl radical scavenging ability of essential HEE was based on the method of Owen *et al.* (Owen *et al.*, 1996). Briefly, the extract was dissolved in the assay buffer (1.0 mL - hypoxanthine, Fe (III), EDTA and salicylic acid) at a concentration of 2.0 mg/mL and appropriately diluted in assay buffer to a final volume of 1.0 mL (giving a range of 0.025-1.0 mg/mL), and 5 µL of xanthine oxidase (18 mU), diluted in 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to initiate the reactions. The sample tubes were incubated for 3 h at 37 °C, at which time the reaction was complete. A 30 µL aliquot of the reaction mixture was analyzed by HPLC using chromatographic conditions as described by Owen *et al.* (Owen *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2003). Chromatographic analysis was performed using a gradient based on methanol/water/acetic acid with a µBondaPak C18 reverse phase column and detection at 325nm. The HPLC equipment had a 2695 separation module and a UV detector 2487 (Waters). Hydroxylation of salicylic acid and hypoxanthine was monitored at  $A = 325$  and  $A = 278$  nm, respectively. The amount of

dihydroxyphenol, 2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBAs), produced by the reaction of salicylic acid with hydroxyl radicals produced was determined from standard curves of the respective dihydroxyphenols.

### 2.6.2 Activity of capture of free radicals with DPPH test in vitro

The methodology used was based on the extinction of the absorption of the radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) at 515 nm (Miranda and Fraga, 2006). The determination of this antioxidant activity was conducted in triplicate using the spectrophotometric method. The technique consists in incubating 500  $\mu$ L DPPH 0.1 mM diluted in ethanol with 500  $\mu$ L of solutions of *H. tiliaceus* extracts in ascending concentrations (0.5; 1.0; 2.5; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0; 30.0; 35.0; 40.0; 45.0 and 50.0 mg/mL) in ethanol. The same routine was observed to prepare the control solution (500  $\mu$ L of the sample in 500  $\mu$ L ethanol) and to prepare the blank solution (ethanol). The percentage of sequestering of the DPPH radical is calculated using the percentage antioxidant activity (AA%) according to the formula:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{blank}}) \times 100] \div Abs_{\text{control}}\}$$

The calculation was conducted in a visible UV light spectrophotometer (8453E, Agilent Technologies). Antioxidant activity (AA) was expressed as IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration in mg/mL of samples or positive controls necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50% compared to the negative control). The lower the IC<sub>50</sub>, the higher is the AA.

## 2.7 Statistics

All experiments were independently repeated at least threefold, with triplicate samples for each treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by test of Tukey.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Determination of total flavonoids, tannins and polyphenols**

The results of total flavonoid, tannin and polyphenol contents are shown in Table 2.

#### **3.2. *In vivo* antioxidant analysis in superoxide deficient and proficient yeast strains**

Figure 1 shows that the incubation of *S. cerevisiae* strains with *H. tiliaceus* ethanolic extract (HEE) did not affect the cell survival in the concentration range employed. In addition, the pre-treatment with the HEE was able to improve the cell survival after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure observed by an increase in the survival. This increase in survival occurred in a dose-dependent way can indicates a possible antioxidant activity, and was similar for all strains used, independently of the gene disruption present.

#### **3.3. Yeast mutagenicity and antimutagenicity assays**

Table 3 shows that the HEE did not induce mutagenicity in *S. cerevisiae* when evaluated by the occurrence of forward mutation in the strain N123. In addition, the extract concentrations used in the range 0.5–1.0 mg/mL are not cytotoxic to yeast. Table 4 reveals that the pre and co-treatment with HEE increased the survival of the cells and significantly decreased the number of mutants after the exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which suggests a potential antimutagenic action against oxidative mutagens. This table also shows that when cells are previously exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then post-incubated with HEE, the antimutagenic potential disappears.

#### **3.4. *In vitro* antioxidant capacity**

Figure 2 shows that the HEE and its fractions exhibit an expressive dose-dependent antioxidant activity. The ethanol extract showed an  $IC_{50}$  equal to 0.375 mg/mL, which reduced the formation of the DHBA species to 15.06 % at the highest concentration (2 mg/mL). Table 5 shows the results of the investigation of antioxidant effect using DPPH strategy ( $IC_{50} = 0.129$  mg/mL), in which the antioxidant activity increases with extract concentration, reaching the maximum value of 97.39% for the 50.0-mg/mL concentration.

#### 4. Discussion

Several age-related dysfunctions, or chronic diseases like diabetes as well as neurodegenerative, cardiovascular and specially carcinogenic diseases affecting humans are associated to the oxidative stress that occurs in a given cell or tissue (Valko *et al.*, 2004, Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007). The usefulness of antioxidants in disease prevention and treatment has attracted considerable attention in past years. In this context, interest in antioxidant plant natural products has grown rapidly in recent decades and numerous studies have been undertaken to search for the most effective antioxidants (Nishino *et al.*, 2005; Tapsell *et al.*, 2006; Johnson, 2007; Cherubini *et al.*, 2008; Hatcher *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2008; Mann *et al.*, 2009).

The pharmacological investigation of the Hibiscus genus reveals interesting biological activities (Maganha *et al.*, 2009). The present study shows an *in vivo* and *in vitro* investigation of the antioxidant and antimutagenic properties of the ethanolic extract of the flowers of *H. tiliaceus* (HEE). Total flavonoid, polyphenol and tannine contents of this extract were also measured.

In order to assess the *in vivo* protective effect of HEE, we used *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in antioxidant defense system (*sod1Δ*, *sod2Δ*, and *sod1sod2Δ*) challenged against  $H_2O_2$  at stationary growth phase (Figure 1). At this stage, strains may survive for weeks or even months in the absence of nutrients, and the increased antioxidant activity protects the cell against the RONS (reactive oxygen and nitrogen species) formed by respiratory metabolism, in a similar fashion to mammalian cells (Lushchak and Gospodaryov, 2005). The results revealed that HEE protected *S. cerevisiae* strains against

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity, showing an antioxidant action. This increase in survival rates occurred in a dose-dependent manner and was similar for all strains used. These peculiarities are often observed alongside the protective effect due to non-enzymatic antioxidants, such as vitamins, polyphenols and retinoids, as well as in sulfurated compounds (Machlin and Bendich, 1987; Nascimento *et al.*, 2007).

The potential mechanism underlying the antioxidant property of HEE was investigated via the *in vitro* assay hypoxanthine/xanthine oxidase, which revealed an expressive reduction in the concentration of DHBAs, the byproducts of the reaction between the hydroxyl radical and salicylic acid (Owen, 1996). Therefore, it can be suggested that the compounds present in HEE may act as scavengers of the hydroxyl radical generated by the Haber-Weiss/Fenton reaction. So, several plant extracts and secondary metabolites derived from plants show *in vitro* antioxidant activity by quenching hydroxyl radicals, evaluated using this assay (Nascimento *et al.*, 2007; Fragoso *et al.*, 2008). In addition, the results of the antioxidant evaluation using DPPH oxidation confirm the dose-response manner pattern of the antioxidant effect of this extract (Table 3). When the DPPH solution is mixed with some hydrogen donor compound, it is reduced to diphenylpicrylhydrazine and loses its violet color (Soares *et al.*, 2003). The degree of coloration loss bears a direct correlation with the activity of elimination of free radicals in the compound evaluated (LEHUÉDÉ *et al.*, 1999). Several series of chemical compounds have been studied and presented a close correlation between DPPH sequestering activity and antioxidant activity in biological and non-biological models (Miranda and Fraga, 2006; Dudonné *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Oktyabrsky *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

In spite of the fact that not every compound present in *H. tiliaceus* is known, it is important to stress that compounds such as polyphenols are present in plants of the Malvaceae family and exert antioxidant and antimutagenic activities (Redzik *et al.*, 2005; Tseng and Lee, 2006; Essop *et al.*, 2008; Annan and Houghton, 2008; Yang *et al.*, 2008). The content of total flavonoids (1.1%), polyphenols (5.5%) and tannins (2.2%) may be responsible, at least in part, for the antioxidant and antimutagenic actions detected. As a rule, it is supposed that the compounds present at highest concentrations contribute for



these protector effects. For instance, the polyphenolic compounds exhibit an excellent antioxidant capacity, and are able to effectively sequester numerous RONS (Borek, 2001; Collins, 2005; Bovicelli, 2007; Magrone *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008; Jalil and Ismail, 2008; Ullah and Khan, 2008; Virgili and Marino, 2008).

Some *Hibiscus* spp. has been shown to elicit antioxidant properties in both *in vitro* and *in vivo* systems. *Hibiscus sabdariffa* extracts inhibit low-density lipoprotein oxidation *in vitro*, decreases serum lipids in cholesterol- and high fructose-fed rats, and efficiently protects against *t*-BOOH-induced hepatic toxicity and in rats and in cultures of rat hepatocytes, indicating antioxidant activity. In addition, the antioxidant properties of *H. sabdariffa* dried flower extracts protected against liver fibrosis induced by carbon tetrachloride, against azathioprine toxicity in rat hepatocytes, against radiation-induced liver damage in rats and against cadmium toxicity in rats (Amin and Hamza, 2005; Liu *et al.*, 2006; Asagba *et al.*, 2007; Adaramoye *et al.*, 2008). *H. rosa sinensis* extract prevented benzoyl peroxide plus UV radiation-induced oxidative damage and has cardioprotective effect in a oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rats (Gauthaman *et al.*, 2006). The ethanolic extract of *H. hispidissimus* showed significant antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective effect against toxicity of paracetamol and carbon tetrachloride in rats (Krishnakumar *et al.*, 2008). Coumarino-lignan and cleomiscosin C isolated from the root bark of *Hibiscus syriacus* showed lipid peroxidation inhibitory activity comparable to vitamin E in an *in vitro* model using rat microsome liver fraction. Recently, Kao and coworkers showed that the polyphenols from *H. sabdariffa* has anti-inflammatory activity in cell culture and in an animal model hepatic inflammation due its antioxidant activity (Kao *et al.*, 2009). In our experimental conditions, we were able to show that HEE has also antioxidant properties.

In order to assess the mutagenic and antimutagenic effect of HEE, we used N123 strain of *S. cerevisiae*. The results of the present mutagenic activity investigation demonstrate that the HEE did not induce mutagenicity in *S. cerevisiae* in the concentration range evaluated (Table 4). In addition, HEE pre- and co-treatment had a protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mutagenesis, increasing the survival and reducing mutagenesis ratio in N123 yeast strains. These findings reinforce the antioxidant effect of the HEE.

It is important to observe that the methanolic extract of *H. tilliaceous* flowers also presents antioxidant and antimutagenic properties (Rosa *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2007). While the methanolic extract has antioxidant activity due the presence of vitamin E and of several compounds derived from phytosteroids, in this work we show that the antioxidant effect of the HEE can be attributed to the presence of polyphenols.

In summary, the results of this study indicate that HEE presents significant *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity, protecting *S. cerevisiae* strains against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress damage. Apart from this, it is not mutagenic and exhibits protective action against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mutagenicity in *S. cerevisiae*.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS - Grant number 06/1979.5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **5. References**

Adaramoye, O., Ogungbenro, B., Anyaegbu, O., Fafunso, M., Protective effects of extracts of *Vernonia amygdalina*, *Hibiscus sabdariffa* and vitamin C against radiation-induced liver damage in rats. *J Radiat Res* 49, 123-131.

Ames, B.N., 1998. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology Letters* 102-103, 5-18.

Ames, B.N., Gold, L.S., 1998. The prevention of cancer. *Drug Metabolism reviews* 30, 201-224.

Amin, A., Hamza, A. A., 2005. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sci.* 77, 266-278.

Annan, K., Houghton, P.J., 2008. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. *J Ethnopharmacol* 119, 141-144.

Asagba, S.O., Adaikpoh, M.A., Kadiri, H., Obi, F.O., 2007. Influence of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. petal on cadmium toxicity in rats. *Biol Trace Elem Res* 115, 47-57.

Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78, 547-581.

Block, G., 1992. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Rev.* 50, 207-213.

Borek, C., 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Nutrition* 131, 1010S–1015S.

Bovicelli, P., 2007. Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *J Pharm Pharmacol* 12, 1703-1713.

Brendel, M., Grey, M., Maris, A., Hietkamp, J., Fesus, Z., Pich, C., Dafré, L., Schmidt, M., Eckardt-Schupp, F., Henriques, J.A.P., 1998. Low glutathione pools in the original *ps03* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Current Genetic* 33, 4-9.

Brondegaard, V.J., 1973. Contraceptive plant drugs. *Planta Medica* 23, 167-172.

Burke, D., Dawson, D., Stearns, T., 2000. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual., CSH Laboratory Press, 171-205.

Calixto, J.B., 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *J of Ethnopharmacology*, 100, 131-134.

Cherubini, A., Ruggiero, C., Morand, C., Lattanzio, F., Dell'aquila, G., Zuliani, G., Di Collins, M., 2005. Mammalian alkaloids. In: The alkaloids chemistry and pharmacology. Arnold Brossi, Academic Press, New York 21, 329-358.

De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591, 8-15.

Do Nascimento, N.C., Fragoso, V., Moura, D.J., Silva, A.C., Fett-Neto, A.G., Saffi J., 2007. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. *Environ Mol Mutagen* 48, 728-734.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M., 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J Agric Food Chem* 6, 154-159.

Essop, A.B., Van Zyl, R.L., Van Vuuren, S.F., Mulholland, D., Viljoen, A.M., 2008. The *in vitro* pharmacological activities of 12 South African *Hermannia* species. *J Ethnopharmacol* 119, 615-619.

European Pharmacopoeia 5th ed.,2005.Determination of tannins, Strasbourg, France, 529.

Fragoso, V., do Nascimento N.C., Moura, D.J, Silva A.C, Richter, M.F., Saffi, J., Fett-Neto, A.G., 2008. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. *Toxicol In Vitro* 3, 559-566.

Gauthaman, K.K., Saleem, M.T., Thanislas, P.T., Prabhu, V.V., Krishnamoorthy, K.K., Devaraj, N.S., Somasundaram, J.S.,2006. Cardioprotective effect of the *Hibiscus rosa sinensis* flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. *BMC Complement Altern Med* 20, 26-32.

German Pharmacopoeia, Deutsches Arzneibuch, 1996. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 630.

Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M.,Torti S.V., 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 11, 1631-1652.

Holdsworth, D., 1991.Traditional medicinal plants of Rarotonga,Cook Island. Part II. *J. Pharmacognosy* 29, 71-79.

Holser, R., Bost, G., Van Boven, M.,2004.Phytosterol composition of hybrid Hibiscus seed oils. *J. Agric. Food Chem* 52, 2546-2548.

Hussain, K., Ismail, Z., Sadikun, A., Ibrahim, P., 2009.Antioxidant, anti-TB activities, phenolic and amide contents of standardized extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. *Nat Prod Res* 3, 238-249.

Iorio, A., Andres-Lacueva, C.,2008.Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem* 48, 1236-1248.

Jalil, A.M., Ismail, A.,2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health. *Molecules* 9, 2190-2219.

Johnson, I.T., 2007..Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc.* 66, 207-215.

Kao, E.S., Hsu, J.D., Wang, C.J., Yang, S.H., Cheng, S.Y., Lee, H.J., 2009. Polyphenols extracted from *Hibiscus sabdariffa* L. inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation by improving antioxidative conditions and regulating cyclooxygenase-2 expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 385-390.

Khan, N., Afaq, F., Mukhtar, H.,2008. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal* 10, 475-510.

Kholkute, S.D., Mudgal,V., Udupa, K.N., 1977.Studies on the ant fertility potentiality of *Hibiscus*. *Planta Medica*, 31, 35-39.

Krishnakumar, N.M., Latha, P.G, Suja, S.R, Shine, V.J., Shyamal, S., Anuja, G.I, Sini, S., Pradeep, S., Shikha, P., Unni, P.K., Rajasekharan, S., 2008. Hepatoprotective effect of *Hibiscus hispidissimus* Griffith, ethanolic extract in paracetamol and CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Indian J Exp Biol* 46, 653-659.

Lambert, J. D.,Yang, C. S., 2003.Mechanisms of cancer prevention by tes constituents. *J. Nutr.*133, 3262S-3267S.

Liu, J.Y., Chen, C.C., Wang, W.H., Hsu, J.D., Yang, M.Y., Wang, C.J. 2006.The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44, 336-343.

Lushchak, V.I., Gospodaryov, D.V., 2005. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International* 29, 187-192.

Machlin, L.J., Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB* 1, 441-445.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr. V.F., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 15, 429-438.

Maganha, E.G., Da Costa, R. H., Rosa, R.M., Henriques J.A.P., Ramos, A.L.L.P., Saffi, J., 2009. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry*. Article in press.

Magrone, T., Candore, G., Caruso, C., Jirillo, E., Covelli, V., 2008. Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness: biological and clinical significance. *Curr Pharm Des* 14, 2733-2748.

Mann, C. D., Neal, C.P., Garcea, G., Manson, M.M., Dennison, A.R., Berry, D.P., 2009. Phytochemicals as potential chemopreventive and chemotherapeutic agents in Hepatocarcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 18, 13-25.

Meng, L., Lozano, Y.F., Gaydou, E.M., Li, B., 2008. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules* 14, 133-140.

Michelin, D.C., Moreschi, P.E., Lima, A.C., Nascimento, G.G.F., Paganelli, M.O., Chaud, M.V., 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosi* 15, 316-320.

Miranda, A. L. P., Fraga, C. A. M., 2006. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. In: Monge A., Ganellin, C. R. *Practical Studies for Medicinal Chemistry IUPAC*.

Nishino, H., Murakoshi, M., Mou, X.Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Satomi, Y., Jinno, K., 2005. Cancer prevention by phytochemicals. *Oncology* 69, 38-40.

Noldin, V.F., Isaias, D.B., Cechinel Filho, V., 2006. Gênero *Calophyllum*: Importância química e farmacológica. *Quimica Nova* 29, 549-554.

Oktyabrsky, O., Vysochina, G., Muzyka, N., Samoilova, Z., Kukushkina, T., Smirnova, G., 2009. Assessment of anti-oxidant activity of plant extracts using microbial test systems. *J Appl Microbiol* 30, 545-554.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* 36, 1235-1247.

Owen, R. W., Wimonwatwatee, T., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 1996. A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer* 5, 233-240.

Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 2003. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chemical Toxicology* 41, 703-717.

Park, E.J., Pezzuto, J.M., 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 231-255.

Redžić, S., Hodžić, N., Tuka, M., 2005. Plant pigments (antioxidants) of medicinal plants *Malva silvestris* L. and *Malva moschata* L. (Malvaceae). *Bosn J Basic Med Sci* 2, 53-58.

Rosa R. M., Moura D. J., Melecchi M. I., Dos Santos R. S., Richter M. F., Camarão E. B., Henriques J. A., De Paula Ramos A. L., Saffi J., 2007. Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol In Vitro* 21, 1442-1452.

Rosa, R. M., Melecchi, M.I., Da Costa Halmenschlager R., Abad F. C., Simoni C. R., Camarão E. B., Henriques J. A., Saffi J., De Paula Ramos A.L., 2006. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. *J Agric food Chem.* 54, 7324-7330.

Silva, C.G., Raulino, R.J., Cerqueira, D.M., Mannarino, S.C., Pereira, M.D., Panek, A.D., Silva, J.F., Menezes, F.S., Eleutherio, E.C., 2009. In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine* 3, 134-137.



Soares, D.G., Andreazza, A.C., Salvador, M., 2003. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem* 51, 1077–1080.

Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C.S., Sullivan, D.R., Fenech, M., Roodenrys, S, Keogh, J.B., Clifton, P.M., Williams, P.G., Fazio, V.A., Inge, K.E., 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med J Austn* 185, 14-24.

Triggiani, V., Resta, F., Guastamacchia, E., Sabba, C., Licchelli, B., Ghiyasaldin, S., Tafaro, E., 2006. Role of antioxidants, essential fatty acids, carnitine, vitamins, phytochemicals and trace elements in the treatment of diabetes mellitus and its chronic complications. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drg Targets* 6, 77-93.

Tseng, T.H., Lee, Y.J., 2006. Evaluation of natural and synthetic compounds from East Asiatic folk medicinal plants on the mediation of cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 4, 347-365.

Ullah, M.F., Khan, M.W., 2008. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compound. *Asian Pac J Cancer Prev* 2, 187-195.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry* 266, 37-56.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & cell Biology* 39, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interactions* 160, 1-40.

Virgili, F., Marino, M.,2008. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 45, 1205-1221.

Wang, W., Zu, Y., Fu, Y., Reichling, J., Suschke, U., Nokemper, S., Zhang, Y.,2009.*In vitro* Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of *Phellodendron amurense* Rupr. from *China*. *Am J Chin Med* 37, 195-203.

Whelan, W.L., Gocke, E., Manney, T.R., 1979. The *CAN1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates. *Genetics* 91, 35–51.

Whister,W.A., 1995.Traditional and herbal medicine in cookislands. *J Ethnopharmacology* 13, 239-280.

Whistler, W.A. 1985. Traditional and herbal medicine in cook islands. *J Ethnopharmacology* 13, 239-280.

Yang, G., Zhou, R., Tang, T., Shi, S., 2008.Simple and efficient isolation of high-qualit total RNA from *Hibiscus tiliaceus* a mangrove associate and its relatives.*Prep Biochen Biotechonl* 38, 257-264.

## TABLES

Table 1 - *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Genotype	Enzymatic defense lacking	Source
EG103 ( <i>SOD</i> )	<i>Mat<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0</i>	None	E.B.Gralla
EG118 ( <i>sod1</i> $\Delta$ )	<i>trp1-289 ura3-52</i> Like SOD+ except <i>sod1::URA3</i>	Cu-Zn SOD (cytosolic)	E.B.Gralla
EG110 ( <i>sod2</i> $\Delta$ )	Like SOD+ except <i>sod2::TRP1</i>	MnSOD (mitochondrial)	E.B.Gralla
EG133 ( <i>sod1</i> $\Delta$ <i>sod2</i> $\Delta$ )	Like SOD+ except <i>sod1::URA3</i> <i>sod2::TRP1</i>	All SOD	E.B.Gralla
N123	<i>Mata his1-7</i>	None, but exhibits low glutathione content	J. Henriques

Table 2 - Determination of total phenols, total tannins and total flavonoids (TFO)

<b>Quantification</b>	<b>Sample</b>	<b>Mean % (SD/CV)</b>
Total flavonoids calculated as Quercetin <sup>1</sup>	<i>H. tiliaceus</i> ethanol extract	1.11 % (0.037/3.3)
Total polyphenols calculated as Pirogalol <sup>2</sup>	<i>H. tiliaceus</i> ethanol extract	5.57 % (0.08/1.3)
Total tannins calculated as Pirogalol <sup>2</sup>	<i>H. tiliaceus</i> ethanol extract	2.20 % (0.15/2.7)

<sup>1</sup>European Pharmacopoeia 5<sup>th</sup> ed. Determination of tannins, Strasbourg, France, 2005.

<sup>2</sup>German Pharmacopoeia, Deutsches Arzneibuch. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 1996.

Table 3 - Induction of forward mutation (*can1*) in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with ethanol extract of *Hibiscus tiliaceus L.* in stationary phase.

Substance	Concentration	Survival (%)	Can/107 survivors <sup>a</sup>
NC <sup>b</sup>	0	100 (143) <sup>c</sup>	13.98 ± 2.2
4NQO <sup>d</sup>	0.5µg/mL	50.28 (88)	344 ± 3.12***
HEE	0.1 mg/mL	93.2 (133)	10.91 ± 1.91
	0.2 mg/mL	92.0 (131)	12.38 ± 1.14
	0.5 mg/mL	84.1 (120)	15.00 ± 0.91
	1.0 mg/mL	80.8 (125)	14.40 ± 1.05

<sup>a</sup> Locus-specific revertants; <sup>b</sup> Negative Control; <sup>c</sup> Number of colonies; <sup>d</sup> Positive Control;  
<sup>e</sup> Mean and standard deviation per three experiments independents; Data significant in relation to negative control group (solvent) at \*\*\*  $P < 0.001$ / One-way ANOVA-Tukey's multiple comparison test.

Table 4 - Effects of ethanol extracts of *Hibiscus tiliaceus L.* on induced mutagenicity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in haploid N123 strain of *S. cerevisiae* in the stationary phase.

Substance	Concentration	Survival (%)	Can/107 survivors <sup>a</sup>
Pre-treatment			
NC <sup>b</sup>	0	100 (221) <sup>c</sup>	10.02 ± 1.67 <sup>e</sup>

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>d</sup>	4 mM	56.38 (125)	29.13 ± 3.21
Ethanol extract	0.1 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	87.5 (109)	27.78 ± 0.98
	0.2 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	91.7 (114)	20.27 ± 2.11*
	0.5 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	89.1 (111)	20.92 ± 1.51*
	1.0 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	86.7 (108)	16.96 ± 1.02*
Co-treatment			
NC <sup>b</sup>	0	100 (156) <sup>c</sup>	16.15 ± 0.39 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>d</sup>	4 mM	67.2 (105)	49.25 ± 5.04
Ethanol extract	0.1 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	89.3 (139)	41.14 ± 2.21
	0.2 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	95.0 (148)	30.22 ± 11.05*
	0.5 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	98.3 (153)	21.88 ± 6.30*
	1.0 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	96.4 (150)	12.44 ± 3.04*
Post-treatment			
NC <sup>b</sup>	0	100 (264) <sup>c</sup>	8.50 ± 2.40 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>d</sup>	4 mM	42.4 (111)	55.25 ± 12.00
Ethanol extract	0.1 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	43.5 (115)	58.23 ± 9.61
	0.2 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	49.2 (129)	65.50 ± 15.32
	0.5 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	38.1 (103)	50.74 ± 8.50
	1.0 mg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.1 (105)	51.36 ± 1.14

<sup>a</sup> Locus-specific revertants; <sup>b</sup> Negative Control; <sup>c</sup> Number of colonies; <sup>d</sup> Positive Control; <sup>e</sup> Mean and standard deviation per three experiments independents; Data significant in relation to positive control group (solvent) at \*  $P < 0.05$  / One-way ANOVA-Tukey's multiple comparison test.

Table 5 – Investigation of the *in vitro* antioxidant potential of ethanolic of extract *H. tiliaceus* L by DPPH strategy.

Concentrations (mg/mL)	(AA%)*
0.5	7.43
1.0	15.44

2.5	22.52
5.0	31.10
10.0	55.13
15.0	61.27
20.0	73.10
25.0	80.13
30.0	83.97
35.0	85.69
40.0	87.96
45.0	90.96
50.0	97.39

---

The correlation between the antioxidant activity (%) and the used extract concentration provided an IC<sub>50</sub> equal to 0.129 mg/mL. AA (%)\* antioxidant activity

## LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1 – Survival Assay with cells of *S. cerevisiae* in stationary phase after treatment with ethanolic extract of *Hibiscus tiliaceus* L flowers against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. The results represent the average of the experiments carried out in triplicate. Data significant in

relation to only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells group at  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ / One-way ANOVA Survival (%) Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 2 - Inhibition of generation of reactive oxygen species by *Hibiscus tiliaceus L* using the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. The ethanol extract showed an IC<sub>50</sub> of 0.375 mg/mL, which reduced the formation of the DHBA species to 15.06 % at the highest concentration (2 mg/mL).



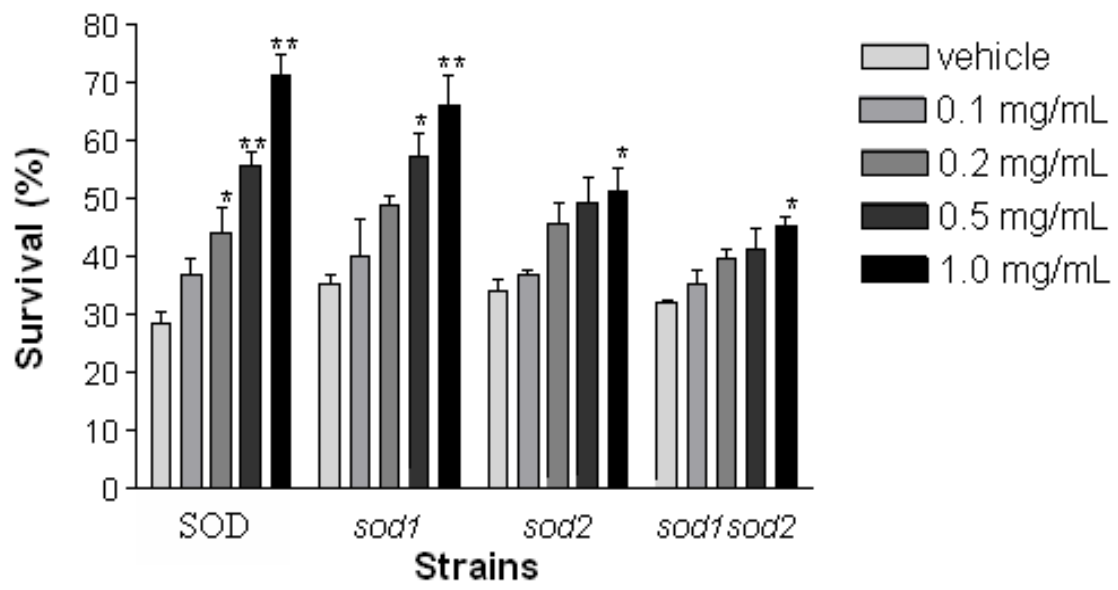


Fig.1

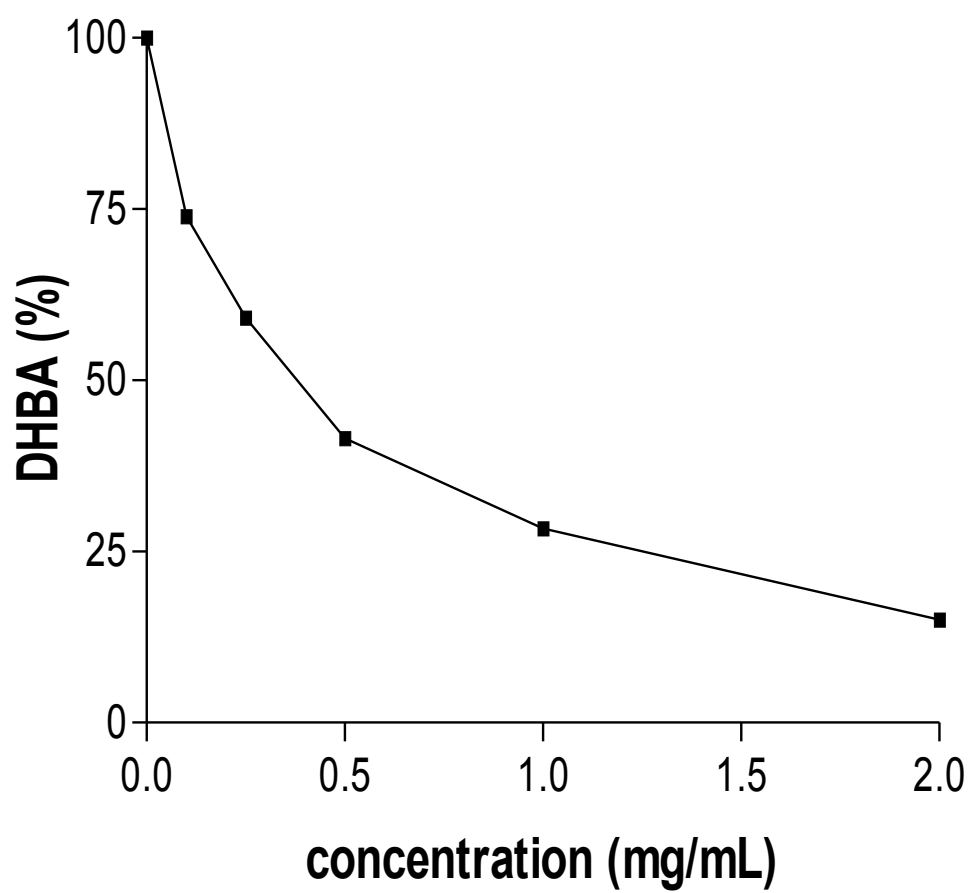


Fig.2

## V-DISCUSSÃO GERAL

Diversas doenças humanas relacionadas à idade, ou doenças crônicas tais como diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e principalmente carcinogênicas estão associadas com o estresse oxidativo que ocorre em uma célula ou tecido qualquer (VALKO *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2007). Há uma quantidade considerável de evidências epidemiológicas que revelam uma associação entre as dietas ricas nas frutas e vegetais quanto a diminuição de doença cardiovascular e determinados tipos de câncer (VALKO *et al.*, 2007).

Supõe-se geralmente que os componentes mais concentrados presentes em algumas plantas são os constituintes ativos que contribuem a estes efeitos protetores. Por exemplo, a vitamina E e os compostos polifenólicos possuem uma excelente capacidade antioxidante, podendo seqüestrar eficientemente inúmeras espécies reativas de oxigênio (ERO), ou seja, protegendo contra o câncer e as doenças cardiovasculares. Como consequência disso, muita atenção é dada na pesquisa de antioxidantes natural protetores e nos mecanismos de sua ação. Nesse sentido, diversos extratos de plantas apresentam forte atividade antioxidante, bem como, antimutagênica, contra danos induzidos por agentes oxidantes (BOREK, 2001; COLLINS, 2005; ROSA *et al.* 2006; 2007; **DE ARCHIVIO *et al.*, 2007; HALLIWELL, 2007**).

O gênero *Hibiscus* apresenta diversas atividades farmacológicas. Conforme mencionado no capítulo 1 o *Hibiscus sabdarifa* é usado na medicina chinesa tradicional para hipertensão, inflamações e desordem do fígado (DAFALLAH *et al.*, 1996; FARAYI, *et al.*, 1999). Estudos mostraram que o *Hibiscus rosa sinensis* possui atividade como antidiarréico, antidiabético, antiespermatogênico e anticonvulsivo (ALAN *et al.*, 1990; SACHDEWA *et al.*, 2003). Além disso, a flor seca do *Hibiscus syriacus* no leste da Ásia é intensamente distribuída, e usada como antielmíntico, antipirético e antifungico (CHEN & FANG, 1993; YUN *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2003). A flor da espécie ***Hibiscus esculentus*** apresenta grande quantidade de quercitina, assim como também o *Hibiscus abelmoschus* que é usado para profilaxia do mosquito do gênero anofelis (SHUI & PENG, 2004; DUA *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos da América encontramos o *Hibiscus vitifolius* que é usado para hipoglicemia (KUNNUMAKKARA *et al.*, 2007).

Apesar de inúmeros estudos que descrevem a composição química e atividades farmacológicas de diferentes espécies do gênero *Hibiscus*, não existem estudos que comprovem a eficácia e a segurança do uso desta planta para fins terapêuticos. Em função disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos mutagênico, bem como antimutagênico, antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus* L. Além disso, realizou-se a determinação de flavonóides, polifenóis e taninos totais desse mesmo extrato.

A atividade antioxidante *in vivo* foi determinada através de ensaio biológico, utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e deficiente no sistema de defesa antioxidante da enzima superóxido dismutase (*SOD*, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*). Os resultados obtidos mostram claramente que a incubação das linhagens com o extrato não teve ação pró-oxidante, e sim uma ação antioxidante, devido a um aumento da sobrevivência das linhagens de *S. cerevisiae* quando expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este aumento de sobrevivência ocorreu de forma dose-dependente e foi semelhante em todas as linhagens utilizadas, independente do tipo de perda de defesa enzimática. Esse efeito parece ser mais significativo na linhagem selvagem, ou seja, proficiente em todas as defesas antioxidantes e na mutante *sod1*, que é deficiente na enzima superóxido dismutase citoplasmática (*Sod1*), mas proficiente na superóxido-dismutase mitocondrial (*Sod2*). Estas características peculiares são observadas com frequência nos antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas, os polifenóis, os retinóides e os compostos sulfurados.

Uma possível capacidade seqüestradora de radicais OH• foi confirmada pelo ensaio *in vitro* da hipoxantina/xantina oxidase no extrato etanólico. Como mostrado na Figura 2 (Capítulo 2), houve uma significativa diminuição na concentração dos ácidos dihidroxibenzoicos (DHBA), produtos da ação do radical OH• sobre o ácido salicílico (OWEN, 1996).

A atividade antioxidante obtida pelo teste DPPH, que detecta a habilidade do extrato etanólico em agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação de DPPH na forma reduzida de DPPH-H (difenilpicrilhidrazina), demonstra que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração do extrato, atingindo o valor

máximo de 97,39% de atividade antioxidante para concentração de 50,0 mg/mL, conforme mostra a tabela 5 (Capítulo 2).

A partir da forte atividade antioxidante verificada pelo extrato etanólico, decidiu-se investigar a ação da atividade mutagênica e antimutagênica na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a linhagem haplóide N123.

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos são classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam sobre o processo que leva a indução de mutações, ou reparo das lesões causadas no DNA (KADA *et al.*, 1978 ZHANG *et al.*, 2006; CHUNG, *et al.*, 2009). Há também uma outra classificação mais detalhada, a qual considera o modo de ação dos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, bem como o ambiente de ação, extra ou intracelular (De FLORA & RAMEL, 1988; FERNANDES, 2007). O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos, os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Em qualquer desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré-ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bio-antimutagênese e estaria relacionado ao processo de reparo das mutações (WATERS *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2006; CHUNG, *et al.*, 2009). Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA (CHUNG, *et al.*, 2009).

Os resultados apresentados na investigação da atividade mutagênica e antimutagênica demonstram que o extrato etanólico de *Hibiscus tiliaceus* L. não é mutagênico na linhagem N123 de *S. cerevisiae* nas doses testadas. As doses mais altas (0.2, 0.5 e 1.0) desse extrato reduzem significativamente a mutagênese induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrando uma potencial atividade antimutagênica. Apesar de não haver um conhecimento total dos compostos encontrados na planta *Hibiscus tiliaceus*, é importante ressaltar que, polifenóis, presentes em plantas da família Malváceas e dotadas de ação antioxidante e antimutagênica (YANG *et al.*, 2008). Determinações Quantitativas encontradas no percentual de flavonóides totais (1,10%), polifenóis (5,57%) e taninos totais (2,20%) podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelas atividades antioxidantes e antimutagências encontradas.

Cabe ressaltar que o extrato metanólico das flores de *Hibiscus tiliaceus* L. também apresenta propriedades antioxidantes e antimutagências (ROSA *et al.*, 2006; 2007). Esses autores demonstraram a presença de vitamina E e vários derivados de fitoesteroides neste extrato, que são também comprovados agentes antioxidantes. Além disso, mostram que o extrato metanólico, inibe a ação mutagênica não só de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também do potente agente oxidante orgânico peróxido de tert-butila, tanto em *S. cerevisiae*, como em fibroblasto de hamster chinês (células V79). Em nenhum desses modelos de estudo, encontrou-se toxicidade ou mutagenicidade do composto, o que também está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Alguns estudos indicam que o extrato aquoso da planta *Hibiscus tiliaceus* tem efeito na consolidação mais rápida de fraturas e possui atividade bactericida, efeito este atribuído às flores frescas e folhas para o tratamento de doenças de pele (WHISTER, 1995). As propriedades físico-químicas do extrato etanólico é que irão determinar sua viabilidade como antimicrobiano, tornando sua avaliação particularmente difícil de ser padronizada. Porém, a difusão em placas (Anexo 1) ainda é a técnica mais comum para avaliação de antibacterianos e antifúngicos de produtos fitoterápicos (KATZUNG, 2003). A maior atividade antimicrobiana do extrato sobre as dezenove bactérias testadas foi

observada sobre a bactéria *Xanthomonas campestris* (31,0 mm) seguida de *Escherichia coli* (28,5 mm) e *Proteus vulgaris* (26,5 mm). A menor atividade foi constatada sobre a bactéria *Yersinia enterocolitica* com a formação de halo de 10,0 mm. Observam-se diferenças significativas entre os halos de inibição das diferentes bactérias avaliadas, conforme tabela 1 (Anexo 1), porém em relação à média destas, os resultados demonstram não existir diferença significativa na ação do extrato sobre Gram-positivas em relação a Gram-negativas. De todas as bactérias testadas apenas *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou halo de inibição. O extrato do *Hibiscus* apresentou atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas, porém, em conformidade com este estudo, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente as diferentes concentrações testadas.

Na avaliação dos resultados das CIM (Anexo 1), observou-se que todos os microrganismos apresentaram-se suscetíveis ao extrato etanólico do *H. tiliaceus*. A variação das CIM das bactérias Gram-positivas foi de 1,00 mg.mL<sup>-1</sup> (*Streptococcus mutans*) a 1,75 mg.mL<sup>-1</sup> (*Staphylococcus epidermidis*). Já a variação das CIM das bactérias Gram-negativas foi de 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> (*Citrobacter freundii*) a 2,50 mg.mL<sup>-1</sup> (*Shigella flexneri*).

Existem fatores que podem interferir nos valores da CIM obtidos através de métodos de diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão extrato-água (RIOS & RECIO, 2005). A metodologia empregada não permitiu visualizar o efeito da concentração do extrato sobre *Pseudomonas aeruginosa*, pois não se observa uma relação direta entre a concentração do extrato etanólico do *Hibiscus* e a densidade ótica (absorbância). Isto pode ter ocorrido pelo fato de que esta bactéria produz um grande número de cápsulas celulares, alterando a viscosidade do meio e em consequência a absorbância. Assim, buscou-se testar diferentes tempos de crescimento visando a redução da produção capsular. Com crescimento de 16 horas (figura 5 – Anexo 1) observou-se uma relação direta entre a concentração do extrato em estudo e densidade ótica, podendo-se determinar a CIM. Neste tempo de incubação, provavelmente a produção de viscosidade por esta bactéria ainda não foi suficiente para interferir na análise.

Para NASCIMENTO *et al.*, (2007), os métodos de atividade antimicrobiana (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Isto porque o método de diluição mostra-se ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa de Petri se constitui em um método qualitativo.

Este trabalho é, portanto, mais uma contribuição ao estudo dos efeitos biológicos das flores do *Hibiscus tiliaceus L.* Os resultados deste estudo indicam que o extrato etanólico das flores do *Hibiscus tiliaceus L.* apresenta significativa atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, protegendo as linhagens de levedura contra danos oxidativos induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, não é mutagênico e mostra atividade protetora contra mutagenicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*. No ensaio de atividade antibacteriana, os resultados da Concentração Inibitória Mínima e difusão em placa, revelaram que todos os microrganismos apresentaram-se suscetíveis ao extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus L.*

Este trabalho é o primeiro relato da atividade antioxidante e mutagênica/antimutagênica do extrato etanólico das flores do *Hibiscus tiliaceus L.* em um modelo *in vivo*. Desta forma, torna-se fundamental à identificação dos compostos responsáveis pelas atividades encontradas, como forma de garantir a eficácia e segurança para uso popular.

## **VI – CONCLUSÕES**

### **1. Conclusão Geral**



Os resultados apresentados neste estudo revelam que o extrato etanólico das flores do *Hibiscus tiliaceus L.*, apresenta atividade antibacteriana, antioxidante e antimutagênica.

## 2. Conclusões Específicas

- A atividade antioxidante *in vivo*, utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mostra claramente que a incubação das linhagens com o extrato não teve ação pró-oxidante, e sim uma ação antioxidante, devido a um aumento da sobrevivência das linhagens de *S. cerevisiae* quando expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- A atividade antioxidante *in vitro* obtido pelo teste DPPH demonstra que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração do extrato, atingindo o valor máximo de 97,39% de atividade antioxidante para concentração de 50 mg/mL.
- A capacidade seqüestradora de radicais OH• pelo extrato foi confirmada através do ensaio *in vitro* da hipoxantina/xantina oxidase. Houve uma significativa diminuição na concentração dos ácidos dihidroxibenzoicos (DHBA), produtos da ação do radical OH• sobre o ácido salicílico.
- Na avaliação das atividades mutagênicas e antimutagênicas o extrato etanólico de *Hibiscus tiliaceus L* demonstrou que não é mutagênico na linhagem N123 de *S. cerevisiae*. As doses testadas desse extrato reduziram significativamente a mutagênese induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrando um potencial atividade anti-mutagênica.
- Determinações quantitativas encontradas no percentual de flavonóides totais (1,10%), polifenóis (5,57%) e taninos totais (2,20%) podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelas atividades antioxidantes e antimutagênica encontradas.

- Pela técnica difusão em placas, a maior atividade antimicrobiana foi observada sobre a bactéria *Xanthomonas campestris* (31,0 mm) e a menor atividade foi constatada sobre a bactéria *Yersinia enterocolitica* (10,0 mm).
- Os resultados demonstram não existir diferença significativa na ação do extrato sobre Gram-positivas em relação a Gram-negativas.
- Na Concentração Inibitória Mínima, observou-se que todos os microrganismos apresentaram-se suscetíveis ao extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus L.*

## **VII – PERSPECTIVAS**

Seria de extrema importância complementar os dados mostrados nesse trabalho para uma melhor compreensão dos efeitos biológicos do extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus* L. com os seguintes testes:

- Comprovação das atividades antioxidantes e antimutagênicas em outros modelos biológicos, como camundongos.
- Ensaio de Atividade Antitumoral utilizando as seguintes linhagens: HL60 (leucemia), HCT-8 (cólon), MCF-7 (mama), B16 (melanoma), CEM (leucemia), MDAMB 431 (mama).
- Determinação da Viabilidade Celular pelo método Colorimétrico do MTT na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT).
- Avaliação da Atividade Hemolítica em sangue de camundongos (*Mus musculus*) diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM).

## VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANASAV, I.B., OSTRACHOVITCH, E.A., KORKINA, L.G. Effect of rutin its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver cromosomes. *FEBS Lett*, v.425, p.256-258, 1989.

ALAM, M., SIDDIQUI, M., HUSSAIN, W. Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. *Fitoterapia*. v.61, 240-242,1990.

ALTMAN, P. M. Australian tea tree oil a natural antiseptic. *Aust. J. Biotechnol.* v.3,p.247-248, 1989.

AMES, B.N.Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*. v.221, p.1256-1263, 1983.

ARAUNA, O.I.Extracts as antioxidant prophylactic agents.*Information* v.8, p.1236-1241, 1997.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLI, G. V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidante activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Beth.) and *S. multicaulis* (Vahl.) *Food Chemitry*, v.84, p.519-525, 2004.

BARBOZA, Y.C.B., SERRA A.A. Ultra-som: Influencia do Ultrassom na Química. *Química Nova*, v.15, p.302-316, 1992.

BECKMAN, K.B., AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, v.78, p.547-581, 1998.

BELITZ, H.D., GROSCH, W. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, p.645- 656, 1988.

BILINSKI T., KRAWIEC Z., LICZMANSKI A., LITWINSKA J. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v 130, p.533-539,1985.

BOEIRA, J.M., SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacol. Toxicol.*, v.89, 287–294, 2001.

BOMBARDELLI, E. Technologies for the processing medicinal plants, in: Wijesekera, R.O.B., *The Medicinal Plant Industry*, RCC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1991.

BONNEFOY, M., DRAI, J., KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse. Med.* v.31, p.1174-1184, 2002.

BOREK, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Nutrition*, v.131, p.1010S–1015S, 2001.

BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. The pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489, p.79-96, 2001.

BRENNAN, R.J., SCHIESTL, R.H. Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research*, v.403, p.65-73, 1998.

BRONDEGAARD, V.J. Contraceptive plant drugs. *Planta Medica*, v.23, p.167-172, 1973.

BROZMANOVÁ, J., DUDÁS A. HENRIQUES, J.A.P. Repair of oxidative DNA damage - an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma*, v.48, p.85-93, 2001.

CAI, Y., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, v. v.74, p.2157-2184, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p. 131–134, 2005.

CAMBIE, R. C., FERGUSON, L. R. Potential functional foods in the traditional Maori diet. *Mutation Research*, v.10, p.1-9, 2003.

CELEGHINI, R.M.S., VILEGAS, J.H.Y., LANÇAS, F.M. Extraction and Quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng: ("guaco") leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.12, p.706-709, 2001.

CHEN, R.T., FANG, S.D. On the chemical constituents of cotton rose *Hibiscus*. *Chinese Traditional and herbal Drug*, v.24, p.227-229, 1993.

CHEN, J.H., HO, C.T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric Food Chemistry*. Chicago: v.45, p.2374-2378, 1997.

CHUNG, S., YANG, S., LAMBERT, D. Shengmin Sang. Antioxidative and anticarcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol*. v. 83, p.11–21, 2009.

COLLINS, M.A. Mammalian alkaloids. In: *The alkaloids chemistry and pharmacology*. Arnold Brossi, Academic Press, New York, v.21, p.329-358, 2005.

CORREA, P.M. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, RJ v.3, p.581-584, 1984.

COSTA, V., FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, v.22, p.217-246, 2001.

CUVELIER, M.E., RICHARD, H., BERSET, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure-activity relationship. *B. Biotechnology and Biochemistry*. Tokyo: v.56, p.324-235, 1992.

CYRNE, L., MARTINS, L., FERNANDES, L. AND MARINHO, H.S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radical Biology & Medicine*, v.34, p.385-393, 2003.

DAFALLAH, A. A., AL-MUSTAFA, Z. Investigation of the antiinflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. *Am. J. Chin. Med*, v.24, p.263-269,1996.

DANI, C., BONATO, D., SALVADOR, M., PEREIRA, D.,HENRIQUES, A.P. Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric. Food Chem*, v.56, p.4268-4272, 2008.

DANI, C., OLIBONI, L. S., VANDERLINDE, R., BONATTO, D., SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food. Chem. Toxicol.* v.45,p.2574–2580, 2007.

DE ARCHIVIO, M., FILESI, C, DI BENEDETTO, R,GARGIULO, R., GIOVANNINI, C., MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist super sanità*.43, p.348-361, 2007.

DE FLORA, S.,RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis.Classification and overview.*Mutation Research*, Amsterdam, v.202, p.285-306, 1988.

DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., McCARROLL, N.E., MAUER, I., VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy.*Mutation Research*, v.521, p.121-135, 2002.

DUA,V.K., PANDEY, A.C., ALAM, M.E., DASH, A.P.Larvicidal activity of *Hibiscus abelmoschus L Malvacea* against mosquitoes. *Journol of the American Mosquito Control Association*, v.22, p.148-155, 2006.

DURÁN, R.M., PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*. Sevilla: v. 44, p. 101-106, 1993.

El-Bayoumy, K., Sinha, R. Molecular chemoprevention by seleniuna genomic approach. *Mutat. Res.* v.591, p.224–236, 2005.

FARAYI, M.H., TARKHAMI, A.H. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *J. Ethnopharmacol*, v.65, p.231-236, 1999.

FARR, D.R., MAGNOLATTO, D., LOLINGER, J. *Protection of food-stuffs from Oxidation*. U.S. Pat 4741915, v.2, p.23-27, 1988.

FERNANDES, P., MANNARINO, S.M., SILVA, C.G., PEREIRA, M.D., PANEK, A.D., ELEUTHERICO, E.C.A. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxidase and menadione stresses in *saccharomyces cerevise*. *Redox. Rep.* v.12, p.236-244, 2007

FERNÁNDEZ-CHECA, J.C., GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A., MORALES, A., MARÖ, M., MIRANDA, M., ARDITE E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors*, v.8, p.7-11, 1998.

FETROW, C., AVILA, J.R. Manual de medicina alternativa para o professional. *Guanabara Koogan*, p.743, 2000.

FETROW, C.W., AVILA, J.R. The complete guide to herbal medicines. Springhouse (PA): *Springhouse Corporation*, p. 618, 2000.

FUGE, E.K., WERNER, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S and MAYER, W. H. (Eds) *Yeast Stress Response*, Heidelberg: Springer-Verlag, p.53-74, 1997.



GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.334-361, 1998.

GRALLA, E.B., KOSMAN, D.J. Molecular genetics of superoxide dismutase in yeast and related fungi. *Advances in Genetics*, 30: p.251-319, 1992.

GRALLA, E.B., VALENTINE, J. S. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*, v.173, p.5918-5920, 1991.

GRANT, C.M., PERRONE, G., DAWES, I.W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen Peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 253, p.893-898, 1998.

GROS, E.G., POLILIO, B., SELDES, A.M., BURTON, G. Introducion al estudios de los productos naturales. *Programa regional desarrollo científico y tecnologico washington D.C*, p.145, 1985.

GUIDOT, D.M., McCORD, J.M., WRIGHT, R.M., REPINE, J.E. Absence of electrontransport (Rho<sup>o</sup> state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p.26699-26703, 1993.

HALIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. Oxford, New York, 2000.

HALIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5 ed., Claredon Press: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.467, p.107-112, 2008.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc. Trans.* v.35, p.1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, v.46, p.531-542, 2009.

HAREL, S., KANNER, J. Lipid antioxidantizing factors in orange peel. *International Fruit Juice Union Proceedings*, v.18, p.185, 1984.

HAYATSU, H., ARIMOTO, S., NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, v.202, p.429-446, 1988.

HENRIQUES, J.A.P., DAFRÉ, A.L., PICADA, J.N., MARIS, A.F., SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L.A., DE BARROS N.M., AZEVEDO J.L. (Eds.), *Biotechnologia na agricultura e na indústria*. Guaíba: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

HENRIQUES, J.A.P., DAFRÉ, L.A., PICADA, J.N., MARIS, A.F. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos, In: Serafini, L.A., Barros, N., Azevedo, J.L. *Biotechnologia na agricultura e na agroindústria*. Editora Agropecuária, Guaíba, 2001.

HERRAIZ, T., CHAPARRO, C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke:  $\alpha$ -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.326, p.378-386, 2005.

HILBER, P., CHAPILLON, P. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. *Physiology and Behavior* v.86, p.164-167, 2005.

HUANG, M.R., RIO, A.G., NICOLAS, A. & KOLODNER, R.D. A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100 (20): p.11529-11534, 2003.

HUSAIN, S.R., CILLARD, J., CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, v.26, p.2489-2491, 1987.

IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Journal*, v.320, p.61-67, 1996.

IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies*, v.56, p.73-76, 1995.

KADA, T., MORITA, K., INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Research*, Amsterdam, v.53, p.351-353, 1978.

KALEMBA, D., KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, v.10 p.813-829, 2003.

KANNER, J., FRANKEL, E., GRANIT, R., GERMAN, B., KINSELLA, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, p.64-69, 1994.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 8ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. RJ, p.145-148, 2003.

KHAN, N., MUKHTAR, H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Letters*, v.269, p.269-280, 2008.

KHOLKUTE, S.D., MUDGAL, V., UDUPA, K.N. Studies on the ant fertility potentiality of *Hibiscus*. *Planta Medica*, v.31, n.2, p.35-39, 1977.

KOBAYASHI, J. Early Hawaiian uses of medicinal plants in pregnancy and childbirth. *J. Trop. Pediatr. EnViron. Child Health*, v.22, p.260-262, 1976.

KOH, T.S. Ultrasonic preparation of fatfree biological materials for elemental analysis. *Analytical Chemistry*, v.55, p.1814-1815, 1983.

KUGE, S., JONES, N. YAP1 dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO Journal*, v.13, p.655-664, 1994.

KUNNUMAKKARA, A.B., NAIR, A.S., AHN, K.S., PANDEY, M.K., YI, Z., LIU, M., AGGARWAL, B.B. Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. *Blood*, v.12, p.5091-5112, 2007.

KUSAMRAN, W.R., TEPWAN, A., KUPRADINUN, P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai Vegetables. *Mut. Res.* v.402, p.247-258, 1998.

KWON, S.W., HONG, S.S., KIM, J.I., AHN, I.H. Antioxidant properties of heat-treated *Hibiscus syriacus*. *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja*, v.1, p.20-21, 2003.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, timol and carvacrol. *J. App. Microb.* v.91, p.453-462, 2001.

LEE B.M., PARK K.K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutation Research*, v.523: p.265-287. 2003.

LEE, D.H., O'CONNOR, T. R., PFEIFER, G.P. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Research*, 30: p.3566-3573, 1999.

LEE, J.H., CHOI, I.Y., KIL, I.S., KIM, S.Y., YANG, E.S. & PARK, J.W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1526 p.191-198, 2001.

LEHMANN, M. Interference of Tannic Acid on the genotoxicity of Mitomycin C, Methylmethanesulfonate and Nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.36, p.195-200, 2000.

LETIZIA, C.S., COCCHIARA, J., LALKO, J., API, A.M. Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*, v 41, p 943-964, 2003.

LIST, P.H., SCHIMDT, P.C. *Phytopharmaceutical technology*. Boca Raton: CRC. p.374, 1989.

LIU, Z.Q., MA, L.P., LIU, Z.L. Making vitamin C lipophilic enhances its perspective effects against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.95, p.49-57, 1992.

LOCK DE UGAZ. *Investigación Fotoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú: *Fondo Editorial*, p.290, 1994.

LONGO, V.D., GRALLA, E.B., VALENTINE, J.S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Biological Chemistry*, v.271, p.12275-12280, 1996.

LONGO, V.D., LIOU, L-L., VALENTINE, J.S., GRALLA, E.B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.365, p.131- 142, 1999.

LOPES, M.I.L., SAFFI, J., ECHEVERRIGARAY, S.,HENRIQUES, J.A.P., SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95,p.437-445, 2004.

LOPES, M.I.L., SAFFI,J., ECHEVERRIGARAY, S., HENRIQUES, J.A.P., SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *J of Ethnopharmacology*, v.95, p.437-445, 2004.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: *Instituto Plantarum*. p.512,2002.

LOWRY, J.B. Floral anthocyanins of some *Malaysian Hibiscus* species. *Phytochemistry*, v.15, p.1395-1396,1975.

LUSHCHAK, V.I., GOSPODARYOV, D.V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International*, v.29, p. 187-192, 2005.

LUSHCHAK, V.I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochimica Polonica*, v.53, p.679-684, 2006.

MACGREGOR, J.T., CASCIANO, D., MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, 455: p.3-20, 2000.

MACHLIN, L.J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*, v.1, p.441-445, 1987.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA JR., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.15, p.429-438, 2002.

MALUZ, M.K.P. Caracterização morfológica, avaliação agrônômica, química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes espécies exóticas de gênero *Salvia*. Erechim-RS. 87f. Tese de Mestrado em Biotecnologia. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, 2005.

MARCANO, D., HASEGAWA, M. Fotoquímica Orgânica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Caracas, p.17-38, 1991.

MARIS, A.F., ASSUMPCÃO, A.L.K., BONATTO, D., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, 39: p.137-149, 2001.

MARIS, A.F., KERN, A.L., PICADA, J.N., BOCCARDI, F., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Glutathione, but not transcription factor Yap1, required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, v.37, p.175-182, 2000.

MARQUES, M.F. Molécula de Óxido Nítrico e sua inter-relação com fator de necrose tumoral-alfa na resposta imunológica induzida por *Styrax comporum* Pohl. Dissertação de Mestrado, FCF-Unesp, SP- Brasil, 2002.

MAXWELL, S.R.J. Prospects for use of antioxidant therapies. *Drugs*, v.49, p.345-361, 1995.

MCCUNE, L.M., JOHNS, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology*, v.82, p.197-205, 2002.

MELECCHI, I. M. Caracterização química de extrato de *Hibiscus tiliaceus* L.: e Estudo comparativo de métodos de extração. Tese de Doutorado. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre*, 2005.

MELLO, J.C.P., SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, p.527-554. cap 24, 2002.

MENDEL, S., YODIM, M.B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, p.304-317, 2007.

MICHELIN, D.C., MORESCHI, P.E., LIMA, A.C., NASCIMENTO, G.G.F., PAGANELLI, M.O., CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 316-320, 2005.

MIGUEL, A., ANDRADE, J.B. Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v.35, p.35-41, 1989.

MIMICA-DUKIC, N., BOZIN, B., SOCOVIC, M., SIMIN, N. Antimicrobial and antioxidant of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.2485-2489, 2004.

MONKS, N.R., FERRAZ, A., BORDIGNON, S., MACHADO, K.R., LIMA, M.F.S., ROCHA, A.B., SCHWARTSMANN, G. *In vitro* cytotoxicity of extracts from Brazilian *Asteraceae*. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 1-6, 2002.

MOURA, D. J., RICHTER, M., BOEIRA, J.M., HENRIQUES, J.A.P., SAFFI, J. Antioxidant properties of  $\beta$ -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, v.31, p.1-10, 2007.



MOUSTACCHI, E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutation Research*, 464, p.35-40, 2000.

NAKAMURA, Y.K., SUGANUMA, E., KUIJAMA, N., SATO, K., OHTSUKI, K. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. *Biosci. Biotech. and Biochem.*, v. 62, p.1161-65, 1998.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.29, p.273-291, 1990.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiolog*, v. 31, p.247-56, 2000.

NASCIMENTO, P.F.C., NASCIMENTO, A.C., RODRIGUES, C.S., ANTONIOLLI, A.R., SANTOS, P.O., JÚNIOR, B.M.A., TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana, uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.108-113, 2007.

NOGUEIRA, M.E.I, PASSONI, M. H., BISO, F.I., LONGO, M.C., CARDOSO, C.R.P.C. dos SANTOS, L.C., VARANDA, E.A. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicol. in vitro*, 2005.

NOLDIN, V.F., ISAIAS, D.B., CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: Importância química e farmacológica. *Quimica Nova*, v.29, p.549-554, 2006.

OLIVEIRA, S.Q., TRENTIN, V.H., KAPPEL, V.D., BARELLI, C., GOSMANN, G., REGINATTO, F.H. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. *Pharmaceutical Biology*, v.43, p. 434-438, 2005.

OWEN, R.W., SPIEGELHALDER B., BARTSCHH.Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix.*GUT* 46, p.225-232, 2000.

OWEN, R.W., WIMONWATWATE, T.,SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H.A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer Prevention*, v.5, p233-240, 1996.

PARK, J.I., GRANT, C.M., DAVIES, M.J., DAWES, I.W. The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress.Generation of free radicals during freezing and thawing.*Journalof Biological Chemistry*, v.273, p.22921-22928, 1998.

PAWLAK, W., KEDZIORA, J., ZOLYNSKI, K., KEDZIORA-KOMATOWSKA, K., BLASZAZYK, J., WITKNOWSKI, P., ZICLENIEWSKI, J. Effect of long term bed rest in man on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in eritrocytes. *J. Gravit. Physiol* ,v.30 p.163-164, 1998.

PICADA, J.N., MARIS, A.F., CKLESS, K., SALVADOR, M. BORISOV, N.N. K., HENRIQUES, J.A.P. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast.*Mutation Research*, p.29-41, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants.*Journal of Natural Products*,v.63, p.1035-1042, 2000.

PRATT, D.E., BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity in soybeans. *Journal of Food Science*, v.44, p.1720-1722, 1979.

PRATT, D.E., HUDSON, B.J.F. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.). *Food antioxidants*, London: Elsevier, p.171, 1990.

PRINGLE, J.R., HARTWELL, L.H. The *saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, life cycle and inheritance. Cold Spring Hargbor, NY, p.97-142, 1982.

RAJALAKSMI, D., NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L., DESHPANDE, S.S., SALUNKHE, D.K. Food Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, p.65-157, 1995.

REVERS, L.F., CARDONO, J., BONATTO, D., GREY, M., FELDMANN H., BRENDDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. *Nucleic Acids Research*, 30 (22): p.4993-5003, 2002.

RICE-EVANS, C.A. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* v.8, p.797-807, 2001.

RICE-EVANS, C.A. MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radic. Biol. Med.* v.20, p.933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposium*, v.61, p. 103-116, 1995.

RÍOS J.L., RECIO M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacol*, p.80-84, 2005.

ROESLER, R., MALTA, G.M., CARRASCO, L.C., HOLANDA, R.B., SOUSA, C.A. S., PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.27, p.53-60, 2007.

ROSA R. M., MELECCHI M. I. S., HALMENSCHLAGER R. C., ABAD F. C., SIMONI C. R., CARAMAO E. B., HENRIQUES J. A. P., SAFFI J., RAMOS A. L. P. Antioxidant and Antimutagenic Properties of *Hibiscus tiliaceus* L. Methanolic Extract. *J. Agric. Food Chem.*, v.54, p.7324-7330, 2006.

ROSA R.M., MOURA D.J., MELECCHI M.I., DOS SANTOS R.S., RICHTER M.F., CAMARÃO E.B., HENRIQUES J.A., DE PAULA RAMOS A.L.; SAFFI J. Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol In Vitro*, v.21, p.1442-1452, 2007.

ROSA, R. M., PICADA, J. N., SAFFI, J., HENRIQUES, J. A. P. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research*, p.231-244, 2007.

ROSA, R.M.,SULZBACHER, K., PICADA, J.N., ROESLER, R., SAFFI, J., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutation Research*, v.563, p.107–115, 2004.

ROSS, J.A., KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and SACHDEWA, A., KHERMANI, L. D. Effect of *Hibiscus rosa sinensis* ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *J. Etnopharmacol*, v.89, p.61-66, 2003.

SANKARA,S.S., NARAYANA, M.S. Pigments on the flowers of *Hibiscus tiliaceus*. *Journal of Science Indian Research*, v.20-b, p.133-134, 1961.

SARGENTI, S.R., VICHNEWI, W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. *Phytochemical Analysis*, v.11, p.69-73, 2000.

SCHULTZ, A.R. Botânica Sistemática II, 3ed. Porto Alegre: Globo, p.189, 1963.

SHEABAR, F.Z., NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of American Oil Chemical Society*, v.65, p.990-991, 1988.

SHUI, G., PENG, L.L. An improved method for the analysis of major antioxidant of *Hibiscus esculentus* L. *Journal of chromatography*, 1048, p.17-24, 2004.

SIERRA RAYNE, MAZZA, G. Biological Activities of Extracts from Sumac (*Rhus* spp.): A Review. *Plant. Foods Hum. Nutr.* v.62 p.165–175, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Expl Physiol.*, v.82, p.291-295, 1997.

SINI A.C., TAPPIN M.R.R., RAMOS M.F.S., MAZZEI J.L., RAMOS M. C.K.V., DE AQUINO NETO F.R., FRIGHETTO N. Linalool from *Lippia Alba*: Study of the reproducibility of the Essential oil Profile and Enantiomeric Purity. *J. Agric .Food Chem.* V.50, p.3518-3521, 2002.

SLEKAR, K.H., KOSMANN, D.J., CULOTTA, V.C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, p.28831-28836, 1996.

SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C., SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *Journal of Agricultura Food Chemistry*, v.51, n. 4, p.1077–1080, 2003.

SOAVE, R.C.F., MENDES, J.A., BELTRATI, C.M. Estudos morfo anatômicos das sementes de *Hibiscus tiliaceus* L. malváceas. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.33, n.1, p.141-148, 1990.

SRINIVASAN, C., LIBA, A., IMLAY, J.A., VALENTINE J.S., GRALLA, E.B. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” as measured by whole

cell electron paramagnetic resonance. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.29187-29192, 2000.

STEVENSON, D.E., HURST, R.D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* v.64, 2900–2916,2007.

SUGIYAMA, K-I., IZAWA, S., INOUE, Y. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, v.275,p.15535-15540, 2000.

TELEFO, P.B., MOUNDIPA, P.F., TCHANA, A.N., MBIAPO, F.T. Effects of an aqueous extract of aloe buettneri, justicia insularis, *Hibiscus tileaceus*, *Dicliptera verticillata* on some physiological and biochemical parameters of reproduction in immature female rats, v.63, n.3, p.193-200, 1998.

TERZIYSKA, A., WALTSCHWA, L., VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, v.109, p.43-52, 2000.

TOMA, M., VINATORU, M., PANIWNKYK, L., MASON, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics and Sonochemistry*, v.8, p.137-142, 2001.

TRUEBA, G.P., SÁNCHEZ, M. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farma. Bonaerense*, v.20, p.297-306, 2001.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84, 2007.

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J., TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.266, p.37-56, 2004.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interactions*, v.160, p.1-40, 2006.

VICENTINO, A.R.R., MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia de DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.384-387, 2007.

VINATURO, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.8, p.303-313, 2001.

VISWEWARA, R., SESHADRI, T.R. Constitution of gossypin. Part I. *Proceedings – Indian Academy of Sciences*, v.24, p.375, 1946.

WANASUNDARA, U., AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *J. Agric. Food. Chemistry*. Chicago: v.42, p.1285-1290, 1994.

WATERS, M.D. Antimutagenic profiles for some model compounds. *Mutation Research*, v.238, p.57-85, 1990.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A. Genetics toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research*. v.437, p.21-49, 1999.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A., BROCKMAN, H.E., DE FLORA S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, p.109-129, 1996.

WEBBER, I.E. Systematic anatomy of the woods of the *Malvaceae*. *Tropical Woods*, v.38, p.15-36, 1934.

WHISTER, W.A. Traditional and herbal medicine in cook islands. *Journal of Ethnopharmacology*, v.13, n.3, p239-280, 1995.

WILMSEN, P.K., SPADA, D.S., SALVADOR, M. Antioxidant Activity of the Flavonoid Hesperidin in Chemical and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4757-4761, 2005.

YANG, G., ZHOU, R., TANG, T., SHI, S. Simple and efficient isolation of high-quality total RNA from *Hibiscus tiliaceus* a mangrove associate and its relatives. *Prep biochem Biotechnol*, v.38, p.257-64, 2008.

YEN, G.C., CHEN, H.Y., PENG, H.H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emergency edible plants. *Food and Chemical Toxicol.*, vol. 39, p. 1045-1053, 2001.

YUN, B., LEE, I., RYOO, I., YOO, I. Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarins-lignans from *Hibiscus syriacus*. *J. Nat. Prod*, v.64, 1238-1240, 2001. *Journal of chromatography*, 1048, p.17-24, 2004.

YUNES, R.A., CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. (Eds.). *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química*. Chapecó (SC): Argos, p. 18-42, 2001.

ZHANG, W., GUO, Y.W., GU, Y. Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: chemistry and biological activity. *Curr. Med. Chem.* v.13, p.2041-2090, 2006.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, p.499-526, 2002.



## **IX-ANEXOS**

**Anexo 1-Avaliação da atividade antimicrobiana pelos métodos difusão em placa e concentração inibitória minina (CIM).**

### **1. Difusão em placa**

Foram selecionados dezenove microrganismos para a análise da atividade antimicrobiana, sendo eles bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas campestris*, *Yersinia enterocolitica*), crescidas previamente em meio Lúria Bentani (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl) durante 24 horas a  $36 \pm 1$  °C.

Os referidos testes foram realizados pelo método de difusão em discos de papel Whatmann 3 com 7 mm de diâmetro, em placas de Petri com meio de cultura Ágar Müeller-Hinton. As culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski estéril nas placas num volume de 200 µL ( $10^8$  UFC/mL). Em cada placa foi depositado um disco de controle negativo (branco), outro de controle positivo contendo 30 µg do antibiótico Cloranfenicol, e três discos com 5 µL do extrato *Hibiscus*. Após a incubação das placas a  $36 \pm 1$  °C durante 24 horas, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel, com o auxílio de um paquímetro.

Os resultados foram expressos em mm pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 %, utilizando o programa SPSS 10.0.1 Standard Version 1989-1999.

### **1.1 Resultados da atividade antimicrobiana por difusão em placa.**

Estudos indicam que o extrato aquoso da planta tem efeito na consolidação mais rápida de fraturas e possui atividade bactericida, efeito este atribuído às flores frescas e folhas para o tratamento de doenças de pele (WHISTER, 1995). As propriedades físico-

químicas do extrato etanólico é que irão determinar sua viabilidade como antimicrobiano, tornando sua avaliação particularmente difícil de ser padronizada. Porém, a difusão em placas ainda é a técnica mais comum para avaliação de antibacterianos e antifúngicos de produtos fitoterápicos, porque é de fácil execução e requer pequenas quantidades de amostra (KATZUNG, 2003).

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados a partir do extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus L.*, usando-se 5 µL do extrato e a metodologia de antibiograma com discos. A maior atividade antimicrobiana do extrato sobre as dezenove bactérias testadas foi observada sobre a bactéria *Xanthomonas campestris* (31,0 mm) seguida de *Escherichia coli* (28,5 mm) e *Proteus vulgaris* (26,5 mm). A menor atividade foi constatada sobre a bactéria *Yersinia enterocolitica* com a formação de halo de 10,0 mm. Observam-se diferenças significativas entre os halos de inibição das diferentes bactérias avaliadas, porém em relação à média destas, os resultados demonstram não existir diferença significativa na ação do extrato sobre Gram-positivas em relação a Gram-negativas.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do extrato etanólico (*Hibiscus tiliaceus L.*) sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5 µL do extrato por disco.

<b>Bactérias Gram - positivas</b>	<b>Clorafenicol (mm)</b>	<b>Halo de inibição médio (mm)•</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	28	21,0 <sup>cd</sup>
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC10240)	26	23,0 <sup>bc</sup>
<i>Sarcina</i> sp. (*)	29	14,5 <sup>de</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	27	23,0 <sup>bc</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	31	16,0 <sup>de</sup>
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 5175)	28	13,0 <sup>de</sup>
Média	28,1	18,4 <sup>#</sup>

Bactérias Gram - negativas		Halo de inibição médio
		(mm)•
<i>Acinetobacter</i> sp. (*)	31	21,0 <sup>bc</sup>
<i>Aeromonas</i> sp. (*)	21	11,0 <sup>e</sup>
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090)	18	12,0 <sup>e</sup>
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	15	28,5 <sup>ab</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	18	12,5 <sup>e</sup>
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	37	26,0 <sup>bc</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	26	26,5 <sup>bc</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	16	N.S. <sup>f</sup>
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC 10708)	33	17,0 <sup>de</sup>
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 13880)	26	21,0 <sup>cd</sup>
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	31	20,0 <sup>cd</sup>
<i>Xanthomonas campestris</i> (*)	33	31,0 <sup>a</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 10460)	20	10,0 <sup>e</sup>
Média	25	19,7 <sup>#</sup>

N. S. = Não sensível

\* Microrganismos obtidos a partir do Instituto Biológico – Campinas, SP.

ATCC: American Type Culture Collection – (USA)

# Não houve diferença significativa entre os halos de inibição pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

• Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De todas as bactérias testadas apenas *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou halo de inibição. O extrato do *Hibiscus* apresentou atividade antibacteriana principalmente sobre bactérias Gram-positivas, porém, em conformidade com este estudo, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente as diferentes concentrações testadas.

## 2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado o método indireto de crescimento bacteriano através da densidade ótica em meio de cultura líquida. Após os resultados obtidos das análises do Antibiograma em Meio Sólido, as dezenove bactérias selecionadas foram cultivadas em meio de cultura caldo Lúria Bentani – (LB) à temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Após o crescimento prévio das culturas, foram inoculados em microtubos 10 µL de pré-inóculo ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) com 1 mL de caldo LB acrescido de 1% do emulsificante dimetilsulfóxido (DMSO) e contendo diferentes concentrações do extrato (MALOZ, 2005). Posteriormente ao processo de inoculação os microtubos foram incubados sob agitação eletromagnética (60 Hz), por um período de 24 horas à temperatura de 32 °C.

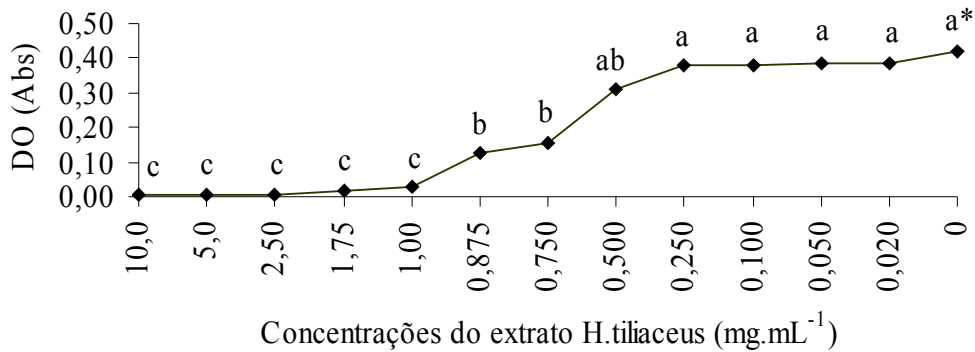
Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas respectivamente, foram transferidas alíquotas e 100 µL da cultura bacteriana para microplacas de fundo chato, realizando-se três repetições de leitura para cada concentração do extrato estudado. Com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano (densidade ótica) para determinar a CIM do *Hibiscus tiliaceus* L. sobre determinada bactéria, submeteu-se a leitura da microplaca através do leitor automático de microplacas (Marca Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), acoplado em computador com programa Kcjunior, com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. As concentrações de extrato testado no experimento para o extrato e os dezenove microrganismos selecionados foram de 2; 1; 0,5; 0,375; 0,25; 0,175; 0,1; 0,0875; 0,075; 0,0625; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,002 e 0%, sendo que estas correspondem à 20,0; 10,0; 5,0; 3,75; 2,50; 1,75; 1,0; 0,875; 0,750; 0,625; 0,500; 0,250; 0,100; 0,050; 0,020 e 0 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença entre as leituras realizadas em 24 horas pela leitura realizada em 0 horas. Os valores médios de densidade ótica foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para determinar Concentração Inibitória Mínima (CIM).

## **2.1 Resultados da atividade antimicrobiana por concentração inibitória mínima (CIM)**

As concentrações inibitórias mínimas foram avaliadas a partir da densidade ótica com comprimento de onda de 490 nm em microplacas. As análises foram realizadas através de testes com concentrações que variam de 10,0 a 0,020 mg.mL<sup>-1</sup>.

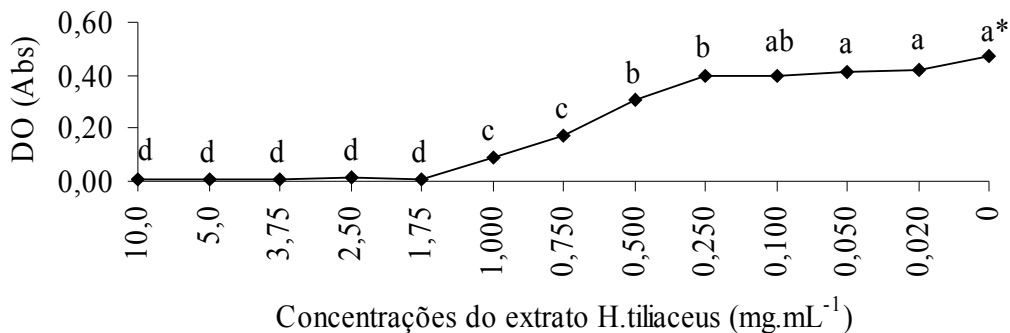
Na avaliação dos resultados das CIM, observou-se que todos os microrganismos apresentaram-se suscetíveis ao extrato etanólico do *Hibiscus tiliaceus* L. A variação das CIM das bactérias Gram-positivas foi de 1,00 mg.mL<sup>-1</sup> (*Streptococcus mutans*) a 1,75

mg.mL<sup>-1</sup> (*Staphylococcus epidermidis*). Já a variação das CIM das bactérias Gram-negativas foi de 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> (*Citrobacter freundii*) a 2,50 mg.mL<sup>-1</sup> (*Shigella flexneri*).



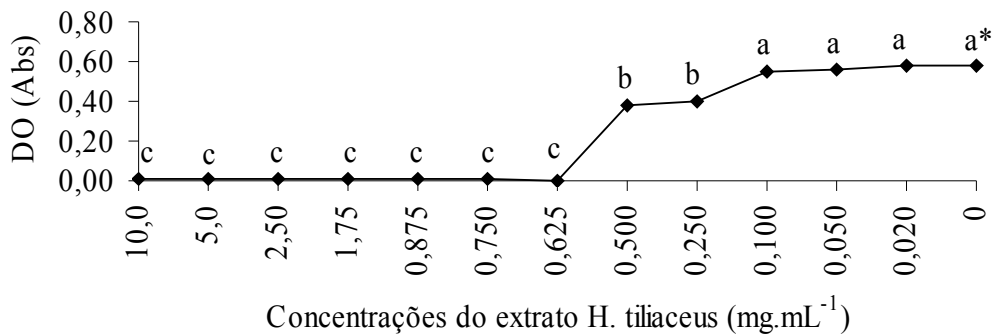
**Figura 1** - Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*.

\* Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



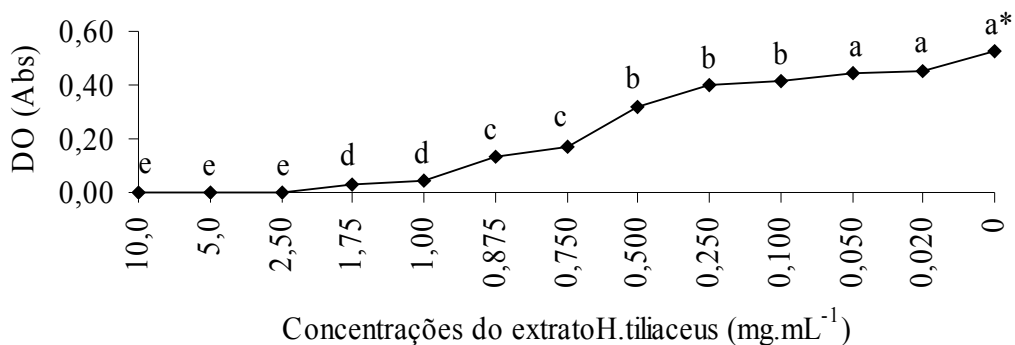
**Figura 2** - Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*.

\* Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



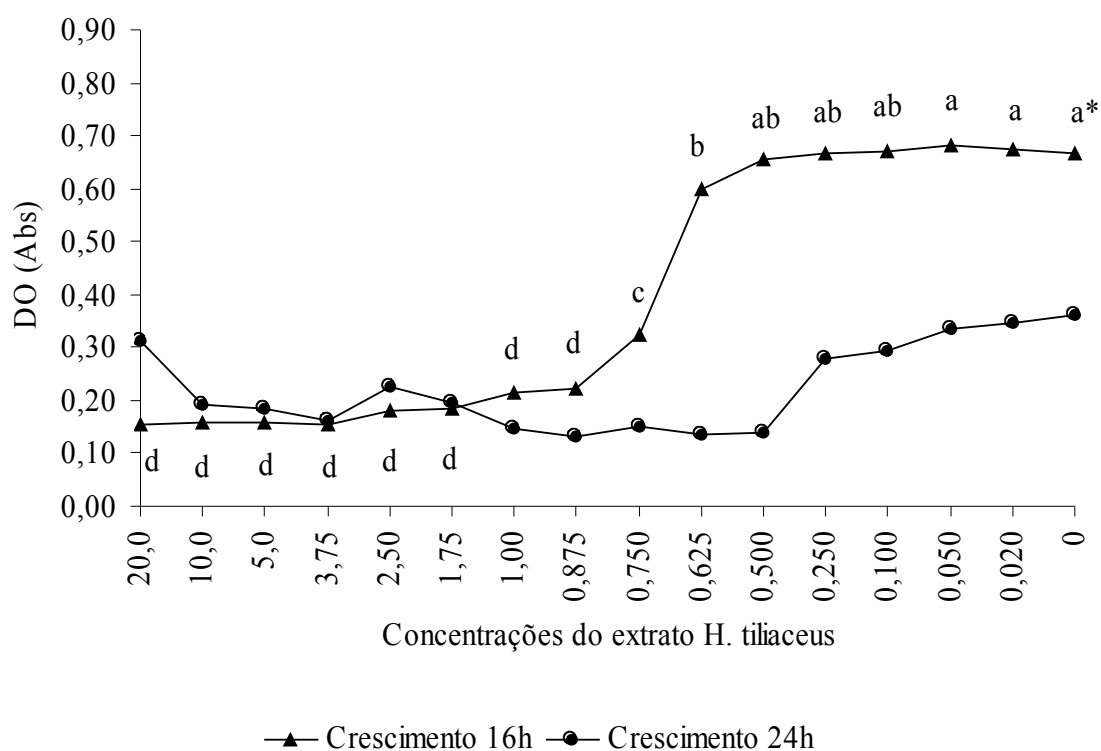
**Figura 3** - Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-negativa *Citrobacter freundii*.

\* Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 4** - Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria Gram-negativa *Shigella flexneri*.

\* Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 5** - Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do extrato *H. tiliaceus* sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

\* Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato *Hibiscus tiliaceus* L.

<b>Bactérias gram - positivas</b>	<b>CIM mg.mL<sup>-1</sup></b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,75
<i>Micrococcus luteus</i>	1,75
<i>Sarcina</i> sp.	1,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,75
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,75
<i>Streptococcus mutans</i>	1,00
<b>Média</b>	<b>1,75</b>
<b>Bactérias gram - negativas</b>	<b>CIM mg.mL<sup>-1</sup></b>



<i>Acinetobacter</i> sp.	1,75
<i>Aeromonas</i> sp.	1,75
<i>Citrobacter freundii</i>	0,625
<i>Escherichia coli</i>	1,75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,75
<i>Proteus mirabilis</i>	1,75
<i>Proteus vulgaris</i>	1,75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,50
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1,00
<i>Serratia marcescens</i>	1,75
<i>Shigella flexneri</i>	2,50
<i>Xanthomonas campestris</i>	1,75
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,875
<b>Média</b>	1,5

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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