

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS, HUMANAS E SOCIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E GENOTÓXICA DO
TRATAMENTO DE *Hibiscus sabdariffa* L. EM RATOS
NEONATOS TRATADOS COM GLUTAMATO
MONOSSÓDICO**

ANA CARLA GUIDINI VALENTINI GHELLER

Sinop – Mato Grosso
Fevereiro de 2015

ANA CARLA GUIDINI VALENTINI GHELLER

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E GENOTÓXICA DO
TRATAMENTO DE *Hibiscus sabdariffa* L. EM RATOS
NEONATOS TRATADOS COM GLUTAMATO
MONOSSÓDICO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Marina Mariko Sugui

Dissertação apresentada ao
PPGCAM como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Ambientais

Sinop – Mato Grosso
Fevereiro de 2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP – CUS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS HUMANAS E SOCIAIS - ICNHS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS



FICHA DE AVALIAÇÃO DO EXAME DE DEFESA DO CURSO DE MESTRADO EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS

1) DISCENTE		
Nome do Discente: Ana Carla Guidini Valentini Gheller	Número de Matrícula: 21115	
Nome do Orientador: Kleber Eduardo de Campos	Linha de Pesquisa: Efeitos fisiopatológicos de produtos naturais.	
2) ARTIGO CIENTÍFICO		
Título: "Avaliação bioquímica e genotóxica do tratamento de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. em ratos neonatos tratados com glutamato monossódico".		
3) EXAME DE DEFESA		
Data: 27/02/2015	Horário: 8:30 h	Local: Sala 15/Bloco 01/UFMT/Sinop
4) COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA –		
Presidente: Kleber Eduardo de Campos		
Membro Interno: Paula Sueli Moreira		
Membro Interno: Daniele Cristina Costa Sabino		
Membro Externo: Fernanda Cristina Esteves de Oliveira		
Membro Suplente: Débora Cristina Damasceno		
5) AVALIAÇÃO E RECOMENDAÇÕES DA BANCA		
Conceito Final: APROVADA		
Recomendações:		

ASSINATURAS:

Discente:

Composição da banca:

Obs: por gentileza letra de forma e legível.

FICHA CATALOGRÁFICA

G947a Guidini Valentini Gheller, Ana Carla.
 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E GENOTÓXICA DO
 TRATAMENTO DE Hibiscus sabdariffa L. EM RATOS
 NEONATOS TRATADOS COM GLUTAMATO
 MONOSSÓDICO / Ana Carla Guidini Valentini Gheller. --
 2015

 70 f. : il. ; 30 cm.

 Orientador: Kleber Eduardo de Campos.

 Co-orientadora: Marina Mariko Sugui.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato
 Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais,
 Sinop, 2015.

 Inclui bibliografia.

SINOPSE

Sinopse:

Estudou-se os efeitos metabólicos e genotóxicos do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* em ratos jovens tratados com glutamato monossódico. Foram avaliados efeitos fisiopatológicos no metabolismo lipídico, glicêmico e proteico, além de efeitos mutagênicos e antimutagênicos.

Palavras-chave: metabolismo, mutagênese, plantas medicinais.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais. À minha mãe, que desde sempre foi a melhor professora que eu poderia ter, e ao meu pai, porque dele herdei o respeito e a admiração pela natureza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força que me concedeu para transpor os obstáculos encontrados. Por permitir que eu vivesse todos os momentos intensamente e por proporcionar mais esta conquista em minha vida. A Ele, toda honra e toda Glória!

À minha família. Ao meu esposo Pedro, por ter entendido de forma tão singular as exigências e necessidades para o desenvolvimento desta pesquisa, apoiando-me, incondicionalmente, para que eu pudesse realizar este propósito. A meus pais Antonio e Nilza, por serem referência e alicerce de minha formação pessoal.

Aos Professores: Dr. Kleber Eduardo Campos e Dr^a. Marina Mariko Sugui, que, sabiamente, caminharam a meu lado e acreditaram em minhas potencialidades.

À Prof^a. Dr^a. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin, que nos cedeu espaço e condições de trabalho no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Químicas (Lippec/UFMT) e à sua equipe que nos auxiliou no manejo dos animais.

À equipe do Laboratório de Fisiologia dos Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FISIOTOX/UFMT) que nos amparou nos primeiros passos dessa pesquisa.

Ao Prof^o Dr. Gerardo Magela Vieira Júnior e sua equipe que colaborou com as análises químicas.

Aos amigos, pelo apoio. Em especial às amigas: Jacqueline, Lúcia e Fabiane, pelos momentos de convivência.

À Faculdade de Ciências Sociais e Aplicadas de Sinop, meus coordenadores e meus alunos da instituição. Obrigada por consentirem minhas ausências durante esse período, por acreditarem na realização desta pesquisa, me incentivando a crescer e persistir na busca dos resultados obtidos.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“O que você faz soa tão alto, que o que você fala ninguém escuta.”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta popularmente utilizada no tratamento de distúrbios metabólicos, como a obesidade. Muitos efeitos terapêuticos do *H. sabdariffa* já estão confirmados, como: antioxidante, hipocolesterolemizante, anti-obesidade, redutor da resistência à insulina, anti-hipertensivo, diurético e uricosúrico. Esse trabalho avaliou os efeitos do extrato aquoso de *H. sabdariffa* no metabolismo e atividade mutagênica e anti-mutagênica em ratos jovens inicialmente tratados com glutamato monossódico. O extrato aquoso foi preparado em forma de infusão, onde animal recebeu, diariamente, a dose de 400mg/kg, via gavagem, durante 15 dias. As amostras dos cálices de *H. sabdariffa* foram obtidas no município de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. A presença de antocianinas foi confirmada pelo teste com cloreto férrico e a presença de compostos fenólicos foi admitida através de cromatografia líquida de alta eficiência. Os animais foram mortos por aprofundamento da anestesia para obtenção de soro e medula óssea. O tratamento com glutamato monossódico, administrado no período neonatal, não levou a morte de ratos utilizados, mas não proporcionou o quadro clássico de obesidade. O teste oral de tolerância a glicose não mostrou alterações nas dosagens entre grupos ($p > 0,05$), enquanto o estudo da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina revelou diferença entre os mesmos ($p < 0,05$). Dos parâmetros bioquímicos avaliados, apenas a alanina aminotransferase revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados. A determinação de proteínas totais, albumina, globulina, colesterol total, triglicerídios, lipoproteína de densidade muito baixa, lipoproteína de alta densidade, e a aspartato aminotransferase não apresentou alteração significativa. O grupo tratado com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* revelou 91% ($p < 0,01$) de redução da frequência de micronúcleos quando comparado ao grupo controle positivo. Os resultados nos permitem inferir que, nas condições testadas, o *H. sabdariffa* é um potencial candidato a agente de prevenção contra a carcinogênese e moderador positivo do metabolismo bioquímico dos animais, devendo, portanto ter suas propriedades insistentemente analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: metabolismo, glutamato monossódico, *Hibiscus sabdariffa*, ratos, antimutagenicidade

ABSTRACT

Hibiscus sabdariffa L. is a plant widely used in the treatment of metabolic disturbances, like obesity. Many of its therapeutic effects are confirmed, as antioxidant, cholesterol lowering, anti-obesity, insulin resistance reducing agents, antihypertensive, diuretic and uricosuric. This study evaluated the effects of aqueous extract of *H. sabdariffa* on biochemical metabolism and mutagenic activity in young rats neonatally treated with monosodium glutamate. The aqueous extract was prepared by infusion method, and each rat daily received a dose of 400mg/Kg by oral route for 15 days. Samples of flowers of *H. sabdariffa* were obtained in Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil. The anthocyanin was confirmed by testing with ferric chloride and the presence of phenolic compounds was admitted via high performance liquid chromatography. The animals were killed by anesthesia followed by decapitation to obtain serum and bone marrow. Treatment with monosodium glutamate, administered in neonatal period has not led to death of mice used, but did not provide the classic glycemic curve for Oral glucose tolerance test, that both groups did not show any changes ($p>0.05$), while the study of sensitivity of peripheral tissues to insulin, insulin test tolerance, showed a hypoglycemic effect of treated group compared to control one ($p<0.05$). The biochemical biomarkers showed only TGP activity a significant difference ($p<0.05$) between the groups evaluated. Moreover, the group treated with the aqueous extract of *H. sabdariffa* revealed 91% ($p<0.01$) of reduction of the micronucleus frequency compared to the positive control group. The results show that, *H. sabdariffa* aqueous extract is a potential agent for preventing carcinogenesis and positive moderator of the biochemical metabolism of the animals and should therefore have its properties repeatedly analyzed.

KEYWORDS: metabolism, monosodium glutamate, *Hibiscus sabdariffa*, rat, antimutagenicity

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	11
2.	ARTIGO I	17
3.	ARTIGO II	43
4.	CONCLUSÃO GERAL	68
5.	ANEXOS	69

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, as principais causas de morte no Brasil são as doenças crônicas. Dados do Ministério da Saúde apontam que, em 2011, 30,7% dos óbitos registrados no Brasil ocorreram por consequência de doenças do sistema circulatório, enquanto que as neoplasias foram causa de 16,9% das mortes ocorridas no país nesse mesmo ano (Brasil, 2012).

O envelhecimento da população aumenta a chance da superposição de morbidades, visto que é comum ver indivíduos mais idosos apresentarem múltiplas doenças. Investiga-se se estas doenças estão relacionadas do ponto de vista etiopatogênico, ou seja, a presença de uma delas pode aumentar a chance de aparecimento da outra, e como elas podem contribuir em conjunto para o aumento da morbimortalidade (Feitosa, 2012).

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, sendo, portanto, uma rica fonte de substâncias bioativas. Nesse sentido, destacam-se as estratégias para a busca de novas substâncias e potenciais medicamentos, a etnofarmacologia. Trata-se de um ramo das ciências que investiga as plantas medicinais utilizadas tradicionalmente em comunidades, combinados com estudos químicos e farmacológicos (Simões et al., 2007)

O uso de plantas com fins medicinais ocorre há muitos anos em consequência de informações que são repassadas por sucessivas gerações (Cardoso, 2006). A primeira referência escrita sobre o uso de plantas como remédios é encontrada na obra chinesa Pen Ts'ao ("A Grande Fitoterapia"), de Shen Nung, que remonta a 2.800 a.C. (Eldin e Dunford, 2001). No Brasil, a fitoterapia é bastante difundida, estimulada pela tradição cultural dos índios, além do alto custo dos medicamentos sintéticos (Volpato et. al., 2002).

Os medicamentos fitoterápicos tem grande aceitação popular, porém, seu uso com fins terapêuticos sem acompanhamento adequado é considerado perigoso, uma vez que nem todas as plantas tiveram todos os efeitos devidamente elucidados, podendo, inclusive, apresentar toxicidade. Além da crença popular quanto ao poder de cura das plantas, a fitoterapia evoluiu e sofisticou-se no sentido de que o poder curativo das plantas não pode mais ser considerado apenas como tradição popular,

mas sim como ciência que vem sendo estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas ao longo dos tempos (Tomazonni et al., 2006).

Entre as plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no Brasil e no mundo, destaca-se o hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). O mesmo tem apresentado grande destaque como tratamento alternativo de diversas patologias, principalmente no tratamento contra o excesso de peso.

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta da família Malvaceae, um arbusto anual vigoroso, que pode atingir até 3 metros de altura, com caule verde ou avermelhado. Suas folhas são alternadas, lobadas e dentadas e com coloração verde ou púrpura. As flores são branco-amareladas, rosas ou púrpuras, com cálices carnosos vermelhos ou brancos que irão formar os frutos (Brasil, 2010). É uma planta tropical nativa da Índia e Malásia, embora cresça amplamente em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios e tornou-se naturalizada em muitas áreas das Américas (Morton, 1987). Sua introdução no Brasil possivelmente ocorreu pelos africanos durante o período em que ocorreu o tráfico de escravos (Morton, 1987; Brasil, 2010).

Esta planta é cultivada de Norte a Sul no Brasil, e conhecida como vinagreira, rosela, quiabo azedo, azedinha, quiabo de angola, caruru azedo e quiabo-roxo. São utilizadas suas folhas e flores no preparo de saladas cruas, refogadas, geléias, sucos e chás, além de ser muito apreciada na culinária típica do Maranhão, sendo um dos principais ingredientes do arroz-de-cuxá (Brasil, 2010).

Dentre os efeitos terapêuticos já comprovados do *H. sabdariffa* estão: antioxidante (Tsai et al., 2002; Mohd-Esa et al., 2010), hipocolesterolemiantes (Hirunpanich et al., 2006; Lin et al., 2007; Gurrola-Díaz et al., 2010); anti-obesidade (Alarcon-Aguilar et al., 2007; Gurrola-Díaz et al., 2010), redutor da resistência à insulina (Gurrola-Díaz et al., 2010), anti-hipertensivo (Faraji et al., 1999; Ajay et al., 2007; Ojeda et al., 2009), quimiopreventivo para câncer de pele (Tseng et al., 1997), diurético (Alarcón-Alonso et al., 2011), uricosúrico (Kuo et al., 2012), citotóxico (Al-Mamun et al., 2011) e antimicrobiano (Al-Mamun et al., 2011). Pode-se destacar ainda o seu uso como: sudorífico, laxante leve, sedativo, para o tratamento de pedra nos rins e para o tratamento de lesão hepática (Akindahunsi e Olaleye, 2003).

Sabe-se que conhecimento tradicional é uma importante fonte de obtenção de novos fitoterápicos. Um levantamento etnobotânico realizado por Bieski et al.

(2011) em um distrito da cidade de Poconé, Mato Grosso, apresentou o *H. sabdariffa* como uma das plantas de maior relação de importância de uso medicinal, o que sugere que a mesma é largamente utilizada na região.

De acordo com Ruiz et al. (2008), ainda hoje são descobertas novas plantas como possíveis fontes de novas drogas. Porém, o uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar uma planta como um medicamento fitoterápico, pois há falta de informações seguras sobre suas propriedades, reações adversas, ação sinérgica e a toxicidade, fatores preocupantes quanto à automedicação (Júnior, 2008).

Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar efeitos fisiopatológicos em ratos, tratados com glutamato monossódico no período neonatal, após a ingestão do extrato aquoso do *H. sabdariffa*, comumente utilizado para o tratamento de diversas patologias, incluindo algumas desordens metabólicas.

Referências bibliográficas:

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, 388-393.

Akindahunsi, A.A., Olaleye, M.T. 2003. Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. Journal of Ethnopharmacology 89,161-164.

Alarcon-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M.D., Almanza-Perez, J.C., Romero-Núñez, E., Campos-Sepulveda, E.A., Vazquez-Carrillo, L.I., Roman-Ramos, R. 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in msg mice. Journal of Ethnopharmacology 114.66–71.

Alarcón-Alonso, J., Zamilpa, A., Alarcón-Aguilar, F., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., Jimenez-Ferrer, E. 2012. Pharmacological characterization of the diuretic effect of

Hibiscus sabdariffa Linn (Malvaceae) extract. Journal of Ethnopharmacology 139,751– 756.

Al-Mamun, A., Khatun, M.H., Nessa, L., Islam, M.D., Munira, S. 2011. *In vitro* evaluation of the antibacterial, cytotoxic and insecticidal activities of *Hibiscus sabdariffa* fruits. Libyan Agriculture Research Center Journal Internation 3,144-149.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2010. Manual De Hortaliças Não-Convencionais. Brasília: MAPA/ACS, 92.

Brasil, Ministério da Saúde. 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?id=2>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

Bieski, I.G.C., Santos, F.R., Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O. 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012,1-36.

Cardoso, C.R.P., 2006. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae) [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Eldin, S., Dunford, A., 2001. Fitoterapia na atenção primária à saúde. São Paulo: Manole.

Faraji, M.H., Tarkhani, A.H.H. 1999. The Effect of Sour Tea (*Hibiscus sabdariffa*) on Essential Hypertension. Journal of Ethnopharmacology 65,231–236.

Feitosa, F.S., Serrano Junior, C.V., Takemura, R.L., Moreira, R.G., Del Giglio, A., 2012. Síndrome metabólica e câncer de mama: revisão sistemática. Revista Brasileira de Clínica Médica 10, 513-520.

Gurrola-Díaz, D.M., García-López, P.M., Sánchez-Enríquez, S., Troyo-Sanromán, R., Andrade-González, L., Gómez-Leyva, J.F. 2010. Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine* 17,500–505.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, 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* 103,252–260.

Júnior, F.V.F. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso da população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 308-313.

Kuo, C.H., Kao, E.S., Chan, K.E., Lee, H.J., Huang, T.F., Wang, C.J. 2012. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of Function Foods* 4,375-381.

Lin, T.Z., Lin, H.H., Chen, C.C., Lin, M.C., Chou, M.C., Wang, C.J. 2007. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* 27,140-145.

Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A., Yeel, C.L. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food chemistry* 122:1055–1060.

Morton, J.1987. Tamarind. In: Morton, J., Miami,F. (Eds.),Fruits of Warm Climates. Creative Resource Systems, Inc., Winterville, pp.115–121.

Simões, C.M.O., 2007. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 1ª edição. Editora da UFRGS, Porto Alegre; Editora da UFSC, Florianópolis, pp.13-29.

Ojeda, D., Frerer, F.J., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., Alvarez, A. 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa* L. Journal of Ethnopharmacology 127;7–10.

Ruiz, A.L.T.G., Taffarello, D., Souza, V.H.S., Carvalho, J.E. 2008. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. Revista Brasileira de Farmacognosia 2, 295-300.

Tsai, P.J., McIntoshb, J., Pearceb, P., Camdenb, B., Jordanc, B.P. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Research International 35, 351–356.

Tomazonni, M.I., Negrelle R.R.B., Centa M.L. 2006. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Texto Contexto Enfermagem 15, 115-21.

Volpato, G. T., Damasceno, D.C., Calderon, I.C.P. Rudge, M.V.C. 2002. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 4, 35-45.

ARTIGO I

STUDY OF METABOLIC EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACT OF *Hibiscus sabdariffa* L. IN RATS NEONATALLY TREATED WITH MONOSODIUM GLUTAMATE

Ana Carla Guidini Valentini Gheller¹, Marina Mariko Sugui^{1,2}, Kleber Eduardo de Campos³

¹Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop. ²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop. ³Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus do Araguaia.

OBS.: O presente artigo será traduzido para a língua inglesa e submetido em breve ao periódico *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. Instruções para os autores em anexo.



CORRESPONDÊNCIA:

Ana Carla Guidini Valentini Gheller. Universidade Federal de Mato Grosso. *Campus* Universitário de Sinop. Av. Alexandre Ferronato nº 1200. Setor Industrial. Sinop/MT.
E-mail: anacarlagv@hotmail.com. Phone: +55 66 9292.1172

RESUMO

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta popularmente utilizada no tratamento de distúrbios metabólicos, conhecida popularmente como vinagreira. De suas flores pode-se obter uma bebida consumida mundialmente. Muitos efeitos terapêuticos do *H. sabdariffa* já estão confirmados, como: antioxidante, hipocolesterolemizante, anti-obesidade, redutor da resistência à insulina, anti-hipertensivo, diurético e uricosúrico. Esse trabalho avaliou os efeitos do extrato aquoso de *H. sabdariffa* no metabolismo lipídico, proteico e glicêmico de ratos jovens tratados com glutamato monossódico no período neonatal. As amostras dos cálices de *H. sabdariffa* foram obtidas no município de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil, dos quais preparou-se uma infusão. Cada animal recebeu, diariamente, a dose de 400mg/kg do extrato, via gavagem, durante 15 dias consecutivos de tratamento. O tratamento com glutamato monossódico, administrado no período neonatal, não levou a morte de ratos utilizados, mas não proporcionou o quadro clássico de obesidade. O teste oral de tolerância à glicose não mostrou alterações nas dosagens entre grupos ($p>0,05$), enquanto o estudo da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina revelou diferença entre os mesmos ($p<0,05$). Dos parâmetros bioquímicos avaliados, apenas alanina aminotransferase revelou uma diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos avaliados. A determinação de proteínas totais, albumina, globulina, colesterol total, triglicerídios, lipoproteína de alta densidade, lipoproteína de densidade muito baixa e aspartato aminotransferase não apresentou alteração significativa. Conclui-se que, na dosagem utilizada, o tratamento com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* em ratos modificou positivamente o metabolismo bioquímico dos animais, devendo, portanto ter suas propriedades investigadas.

PALAVRAS-CHAVE: metabolismo, glutamato monossódico, *Hibiscus sabdariffa*, ratos, resistência à insulina.

1. Introdução

No ramo científico, há uma série de induções experimentais de natureza física e/ou química que levam os animais em estudo a certas condições fisiopatológicas, para que sejam estudadas a fim de elucidar melhor seus mecanismos, e também para sua prevenção ou tratamento (Campos et al., 2005). Entre estas condições, destaca-se há muitas décadas, a utilização do aminoácido glutamato monossódico em ratos.

A metodologia empregada com glutamato monossódico durante o período neonatal é bem utilizada em estudos, sobretudo por seu sucesso no desenvolvimento da obesidade animal. Como é um aminoácido neuroexcitatório lesivo, irá agir no núcleo arqueado do hipotálamo destruindo de 80% a 90% dos neurônios locais. Desta forma, leva a alterações dos sistemas biológicos como redução da sensibilidade à insulina, dislipidemia, prejuízos da termogênese, hiperfagia, desordem funcional no sistema nervoso autônomo, além de provocar o aumento do acúmulo de tecido adiposo visceral e também hiperinsulinemia (Alponti et al., 2011; Nemeroff et al., 1977; Oliveira & Lemos, 2010).

Sabe-se que obesidade tem um papel importante nos fatores de risco para doenças cardiovasculares, as desordens no metabolismo de lipídeos são caracterizadas por valores séricos elevados de colesterol, triglicerídeos, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) e diminuição de HDL (lipoproteína de alta densidade) (D'adamo et al., 2015).

O quadro de intolerância à glicose e resistência à insulina torna-se de grande destaque em estudos fisiopatológicos, uma vez que a sensibilidade dos tecidos insulino-dependentes são facilmente alterados quando ocorrem distúrbios de vias metabólicas. Estas condições podem ocorrer unicamente ou em conjunto da falha da secreção pancreática da insulina, a não conformação molecular ideal deste hormônio produzido, o tempo de ação em tecidos periféricos, ação nos sítios ativos inadequados, em seus segundos mensageiros intracelulares, e também na apresentação do transportados de glicose (GLUT-4) na membrana da célula-alvo (Campos et al., 2007)

Portanto, é de grande interesse da comunidade científica melhor compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia de distúrbios metabólicos,

destacando-se a dislipidemia, defeitos genômicos e também distúrbios glicêmicos acompanhados ou não do desenvolvimento de resistência à insulina, a fim de reverter esse quadro e, por conseguinte, evitar o desenvolvimento de suas complicações (Campos et al., 2007).

No caso da obesidade, a fim de controlar sua taxa presente na população, destacam-se a atividade física e alterações na dieta alimentar. A dieta ideal inclui a diminuição da ingestão alimentar de gordura e o aumento do consumo de fibras a fim de diminuir a absorção intestinal de lipídios (Campos et al., 2006). Além disso, o uso de plantas medicinais possui o objetivo de promover a diminuição da obesidade é bastante utilizado atualmente (Volpato et al., 2002).

A utilização das plantas medicinais faz parte da história da humanidade, tendo uma importância muito significativa, tanto no que se refere aos aspectos medicinais, como culturais (Millani et al., 2010; Pinheiro et al., 2011). Estes compostos naturais auxiliam o organismo a normalizar funções fisiológicas e metabólicas prejudicadas, restaurar a imunidade comprometida, promover a desintoxicação e também o rejuvenescimento (França et al., 2008).

No Brasil, o uso de plantas medicinais com fins terapêuticos possui respaldo na tradição cultural indígena, além de ser uma opção economicamente viável (Volpato et al., 2002). Neste sentido, o hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) tem exibido destaque na prevenção e terapia alternativa de diversas patologias, principalmente no tratamento contra excesso de peso. É bastante frequente a apresentação dessa planta como auxiliar na redução de peso corporal em diversos veículos de mídia social, especialmente voltados a saúde e bem estar, conceito que popularizou o uso do hibisco nos últimos tempos.

Muitos efeitos terapêuticos atribuídos ao *H. sabdariffa* já estão confirmados experimentalmente, como antioxidante (Tsai et al., 2002; Mohd-Esa et al., 2010), hipocolesterolemizante (Hirunpanich et al., 2006; Lin et al., 2007; Gurrola-Díaz et al., 2010); anti-obesidade (Alarcon-Aguilar et al., 2007; Gurrola-Díaz et al., 2010), redutor da resistência à insulina (Gurrola-Díaz et al., 2010), anti-hipertensivo (Faraji et al., 1999; Ajay et al., 2007; Ojeda et al., 2009), quimiopreventivo para câncer de pele (Tseng et al., 1997), diurético (Alarcón-Alonso et al., 2011), uricosúrico (Kuo et al., 2012), citotóxico e antimicrobiano (Al-Mamun et al., 2011). Pode-se destacar

ainda o uso do *H. sabdariffa* como: sudorífico, laxante leve, sedativo, no tratamento de pedra nos rins e tratamento de lesão hepática (Akindahunsi e Olaleye, 2003).

Estudos têm demonstrado que o extrato aquoso dos cálices de *H. sabdariffa* possui efeito na redução dos níveis de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos, sugerindo que esta planta possui possível efeito anti-obesidade (Kim et. al., 2003). As propriedades terapêuticas do *H. sabdariffa* estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos (Patel, 2014).

Por questões éticas, não é comum o uso de seres humanos como objeto experimental, principalmente pela dificuldade em se observar todas suas alterações decorrentes do uso de uma planta medicinal. Sendo assim, o modelo animal experimental utilizado nesse trabalho foi o rato Wistar, por apresentar características fisiológicas, anatômicas e orgânicas semelhantes aos do ser humano (Schanaider e Silva, 2004; Quinn, 2005). É possível ainda, utilizar-se de protocolos experimentais já propostos e amplamente utilizados para a indução da obesidade em animais, bem como efeitos mais amplos e complexos, como os que ocorrem em desordens metabólicas em animais de acordo com sua etiologia, sendo que alguns deles já foram amplamente caracterizados.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos metabólicos proporcionados pelo consumo do extrato aquoso do *H. sabdariffa* por ratos machos Wistar jovens tratados com glutamato monossódico no período neonatal.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UFMT) pelo número de protocolo 23108.705702/13-9. Foram utilizados ratos Wistar machos neonatos que receberam por via subcutânea (sc) solução de glutamato monossódico (MSG; Sigma, G-1626, St. Louis, MO, USA) diluído em solução salina, na dose de 4,0 mg/g de peso corpóreo, sc, no 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dias de vida (Ribeiro et al., 1989; Mello et al., 2001; Campos et al., 2007, 2008). Os mesmos foram mantidos com suas respectivas mães até alcançarem 21 dias, período este correspondente à lactação. Após este período, os filhotes desmamados foram transferidos para gaiolas coletivas (4 animais por gaiola) onde passaram por

um período de adaptação no Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva, Universidade Federal de Mato Grosso/Campus Universitário do Araguaia. Permaneceram em gaiolas coletivas em temperatura ambiente de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas e umidade relativa de $60 \pm 5\%$. Todos os animais receberam ração **Purina**[®] e água filtrada *ad libitum*.

Aos 70 dias de vida, todos os ratos foram pesados e o comprimento naso-anal foi medido para a obtenção do Índice de obesidade de Lee no primeiro e último dia de tratamento com o fitoterápico. Foi considerado o valor menor ou igual a 0,300 como normal. Por outro lado, ratos com valor superior a 0,300 são considerados obesos (Bernardis et al., 1968).

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corpóreo (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (mm)}} \times 10$$

2.2 Procedimentos experimentais

2.2.1 Tratamento com *Hibiscus sabdariffa* L.

Amostras dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* foram obtidas no município de Barra do Garças – Mato Grosso no período de outono (meses de março a junho de 2013), e desta forma foram secas em estufa aerada à temperatura de 50°C , por um período de três dias e moídas para o preparo do extrato aquoso por processo de infusão. O extrato aquoso foi resfriado sob agitação, filtrado e determinada concentração em mg/mL. As alíquotas do extrato foram mantidas em freezer (-20°C) em pequenos frascos âmbar até o dia do seu uso no tratamento dos animais.

Após a avaliação do peso corpóreo e comprimento naso-anal, todos os ratos machos foram divididos em dois grupos: grupo controle (**C**), em que ratos foram tratados com água ($n=10$) e grupo (**HS**), ratos tratados com extrato aquoso de *H. sabdariffa* ($n=16$). O tratamento foi oral, por via intragástrica (gavage), por quatorze dias, na dose de 400mg/kg/dia de peso corpóreo, adaptado de Peng et al. (2011). Considerando o ganho de peso dos animais durante o tratamento, a dose foi ajustada periodicamente. A quantidade de ração oferecida para os grupos foi pesada todos os dias, e a média de consumo de ração por animal foi avaliada.

2.2.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Para avaliação do desenvolvimento da intolerância à glicose foi utilizado um marcador empregado rotineiramente na clínica, – teste oral de tolerância à glicose (TOTG) em todos os animais no 12º dia de tratamento. O procedimento usado para este teste delineia que, após jejum prolongado (em torno de 12 horas), foi coletada uma gota de sangue para determinação glicêmica por glicosímetro convencional OneTouch® Ultra® 2 (tempo 0 = jejum). Em seguida, os ratos receberam solução de glicose (200 g/L) via intragástrica (gavage) na dose de 2,0 g/Kg peso corpóreo. Depois de 30, 60 e 120 minutos, após a administração desta solução, as outras glicemias foram determinadas (Moura et al., 2002). A resposta da glicose durante o TOTG foi avaliada pela aparência da curva (Campos et al., 2007) e a estimativa total obtida na área sob a curva pelo método trapezoidal (ASC) (Tai et al., 1994).

2.2.3 Teste de tolerância à insulina (TTI)

O teste de tolerância à insulina foi aplicado a todos os ratos na véspera do final do tratamento (14º dia). Após jejum prolongado (em torno de 12 h), foi coletada uma gota de sangue para determinação glicêmica por glicosímetro convencional (tempo 0). Todos os ratos receberam solução de insulina do tipo *NPH*, via subcutânea, na dose de 30mU/100g peso corpóreo. Decorridos 15, 30 e 60 minutos após a administração insulínica, foram determinadas as glicemias (Nogueira et al., 1990).

2.2.4 Eutanásia e obtenção do soro

No último dia de tratamento foi realizada a eutanásia de todos os animais, antecedido de anestesia. O sangue foi coletado em tubos de ensaio livres de anticoagulantes e centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado como soro e estocado a -20°C para posteriores determinações de biomarcadores.

2.2.5 Análises bioquímicas

Todos os parâmetros bioquímicos foram mensurados por kits convencionais, utilizando-se um analisador bioquímico semi-automático. As concentrações séricas

de proteínas totais foram determinadas pelo método colorimétrico; enquanto que os níveis séricos de colesterol total, triglicerídios, lipoproteína de densidade alta (HDL) foram determinadas pelo método enzimático. Atividades hepáticas das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram mensuradas através da metodologia de cinética enzimática (Young et al., 2000). Os resultados foram expressos mg/dL para proteínas totais, colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína HDL. Para as determinações das atividades enzimáticas de ALT e AST, os resultados foram expressos em U/L.

O valor estimado do nível sérico da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foram estimados como base nas determinações das concentrações séricas de triglicerídios pelo cálculo proposto por Friedewald et al. (1972), com os resultados expressos em mg/dL.

2.3 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Para comparação entre seus valores médios, foi empregado teste t de Student (Vieira, 1997).

3. Resultados

A Tabela 1 mostra que o Índice de Lee calculado em todos os ratos não demonstrou o quadro clássico de obesidade, pois nenhum valor apresentou 0,300 ou maior, independente do grupo ou do dia mensurado. Contudo, o tratamento diário do extrato aquoso de *H. sabdariffa*, grupo (HS), em apenas quinze dias de tratamento levou a uma diminuição significativa de peso corpóreo comparado ao grupo controle (C).

Os testes glicêmicos realizados neste estudo permitem comparações entre valores, sendo possíveis resultados significativos comparando as glicemias ao longo do tempo no mesmo grupo, e também as glicemias entre grupos, no mesmo tempo medido. A Figura 1 mostra as glicemias do TOTG, e em ambos os grupos houve um aumento glicêmico nos tempos 30 e 60 minutos em relação ao jejum (tempo 0) ($p < 0,05$), porém não foram encontradas alterações nos níveis de glicose entre grupos ($p > 0,05$). Ainda na avaliação destas glicemias, a Figura 2A mostra as áreas sob a curva glicêmica do TOTG, destacando os intervalos de cada leitura glicêmica

(áreas parciais), e também seu valor geral (área total). O tratamento desta planta aparenta não influenciar na carga glicêmica do teste ($p>0,05$), porém quando é analisada a glicemia média de cada intervalo (Figura 2B), o intervalo de 30 a 60 minutos elevou-se em ambos os grupos ($p<0,05$).

O estudo da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina é mostrado na Figura 3, sendo as glicemias coletadas durante o Teste de tolerância à insulina (TTI). As curvas glicêmicas dos ratos mostram que, após a administração de insulina exógena, ocorre uma queda glicêmica em todo o transcorrer do teste em ambos os grupos, nos tempos 15, 30 e 60 minutos ($p<0,05$). Quando os valores são comparados entre grupos, o tratamento com *H. sabdariffa* (grupo HS) leva a uma maior queda glicêmica no teste aos 15 minutos e uma recuperação dos níveis de glicose aos 60 minutos, sendo sua glicemia maior que no grupo C ($p<0,05$).

De forma similar ao TOTG, a Figura 4A mostra as áreas parciais e totais sob a curva glicêmica do TTI, mas também não apresentou diferenças entre os valores obtidos ($p>0,05$). Quando se analisa as médias glicêmicas por minuto de cada intervalo do TTI (Figura 4B), os tempos 15 a 30 minutos e também de 30 a 60 minutos foram diminuídos em relação ao primeiro intervalo ($p<0,05$), mas não entre grupos ($p>0,05$).

A Tabela 2 mostra os parâmetros bioquímicos séricos avaliados neste estudo. A atividade da alanino aminotransferase (ALT) mostrou uma diminuição significativa quando os ratos foram tratados com o extrato da planta ($p<0,05$). A determinação de proteínas totais, albumina, globulina, colesterol total, triglicerídios, colesterol HDL, VLDL e AST não apresentou alteração significativa ($p>0,05$). Os valores médios obtidos em ambos os analitos apresentam-se muito próximos, tanto no grupo tratado com o extrato aquoso de *H. sabdariffa*, quanto no grupo controle.

3. Discussão

O tratamento de glutamato monossódico, administrado no período neonatal, não levou a morte de ratos utilizados no presente estudo, sendo assim uma metodologia segura e válida que não implicou em perda de animais e alteração do número amostral proposto na metodologia, grupo (C), $n=10$ ratos e grupo (HS), $n=16$ ratos.

Uma investigação do metabolismo de animais vivos, invariavelmente deve ser analisada de forma flexível, visto que as condições a que os animais estão inseridos e a variabilidade biológica esperada entre seres vivos devem ser consideradas diante dos resultados encontrados e esperados. Além disso, as plantas medicinais são compostas por uma numerosa gama de substâncias ativas. Dependendo das condições climáticas, estes vegetais podem produzir diferentes componentes químicos a partir de seu metabolismo. Dessa forma, os efeitos fisiopatológicos produzidos por plantas da mesma espécie, porém cultivadas em regiões distintas, podem ser diferentes (Simões et al., 2007).

Os dados deste estudo mostram que a determinação do Índice de Lee calculado em todos os ratos não demonstrou o quadro clássico de obesidade, pois nenhum valor do índice foi de 0,300 ou maior, independente do grupo ou do dia mensurado. Possivelmente o fato dos animais serem ainda muito jovens pode estar relacionado com o não desenvolvimento da obesidade nesses animais, visto que o Índice de Lee é normalmente empregado em ratos após 90 dias de vida (Ribeiro et al., 1989; Mello et al., 2001; Campos et al., 2007, 2008; Luz et al., 2010; Zhang et al., 2010; Chen et al., 2013; Hernández-Bautista et al., 2014).

Zhang et al. (2010) utilizam o mesmo protocolo de indução de obesidade em ratos com glutamato monossódico, e obtiveram a confirmação da obesidade somente após 6 meses de vida dos animais. Da mesma forma, Luz et al. (2010) afirmam que o tratamento com MSG no período neonatal induz a obesidade em animais adultos. Os autores encontraram um aumento de estoques de gordura corporal nesses animais de cerca de 140%, porém observaram uma redução no consumo de alimentos, o que os mesmos sugerem ser justificado pela redução significativa no gasto energético apresentado pelos ratos.

Chen et al. (2013) observaram que, em comparação com ratos normais, os ratos tratados com MSG exibiram sintomas típicos da síndrome metabólica, apesar da menor ingestão alimentar em relação ao grupo controle. A confirmação da obesidade foi estabelecida aos seis meses de vida dos animais, alimentados durante o período de aclimação com ração padrão para roedores *ad libitum*. O estudo de Hernández-Bautista et al. (2014) mostrou que o Índice de Lee, triglicérides, colesterol total, e os níveis de transaminases aumentou, enquanto a tolerância à

glicose diminuiu e níveis de sensibilidade à insulina foram notavelmente alterados a partir do quarto mês de idade, de ratos tratados com MSG no período neonatal.

Quanto ao ganho de peso, foi visto que o grupo HS ganhou apenas 37,9g durante os 14 dias de tratamento, enquanto o grupo C mostrou um ganho de 54,2g no mesmo período (Tabela 1). Desta forma, esta diminuição de ganho de peso ao tratamento pode sugerir a uma modificação metabólica pelo extrato vegetal. Nossos dados corroboram com os encontrados por Alarcon-Aguilar et al. (2007), que também destacaram uma diferença significativa no ganho de peso entre ratos obesos tratados com extrato aquoso de *H. sabdariffa* e não tratados. Neste estudo, o uso do extrato reduziu o peso corporal de ratos obesos em 9,6%, dado relacionado com o conceito de que os cálices do *H. sabdariffa* contêm substâncias bioativas que podem ser úteis na prevenção e tratamento de obesidade, sendo reforçado também na diminuição da absorção lipídica intestinal (Carvajal-Zarrabal et al, 2009).

Os mecanismos pelos quais o *H. sabdariffa* leva a uma redução no ganho de peso corporal ainda não são totalmente esclarecidos (Alarcon-Aguilar et al., 2007). Esse mecanismo pode estar relacionado à capacidade deste extrato em modular fatores de transcrição de adipócitos (Kim et al., 2007). Além disso, relatos indicam que este tipo de tratamento pode levar à saciedade por meio de um estímulo anorexígeno no centro da saciedade localizada no hipotálamo, diminuindo o ganho de peso corpóreo (Peng et al., 2011) assim como inibe a atividade da α -amilase bloqueando a absorção de carboidratos no intestino delgado, efeito obtido através da modulação da vias de sinalização PI3-K/Akt, que desempenham importantes papéis durante a adipogênese (Valerio et al., 2006).

A análise da secreção e ação do pâncreas endócrino é bem descrita no TOTG e sua área sob a curva nas Figuras 1 e 2, respectivamente. O TOTG é o registro da captação glicêmica dos tecidos periféricos (músculo esquelético e tecido adiposo), sendo um método específico para diagnosticar a intolerância à glicose, pois mimetiza os eventos fisiológicos após uma refeição. Sua curva mostra a capacidade de absorção e retorno glicêmico, demonstrando o desempenho da insulina endógena nos tecidos periféricos (Campos et al., 2007; Neto et al., 2011). A aparência das curvas em ambos os grupos possuem uma resposta clássica, sendo que aos 30 minutos houve um pico glicêmico (absorção intestinal), e após esta medida, os valores glicêmicos diminuem (30 e 60 min) até retornar próximos ao

tempo de jejum aos 120 minutos (retorno glicêmico) (Campos et al., 2007; Mello et al., 2001; Valerio et al., 2006). De acordo com os dados deste estudo, o extrato de *H. sabdariffa* não influenciou na resposta endógena da insulina para este teste, ou seja, não influencia na secreção e ação insulínica em tecidos periféricos. Em contrapartida, um estudo com este extrato de planta mostra que em ratos houve uma diminuição da glicemia de jejum conforme o tratamento progredia (Alarcon-Aguilar, 2007).

Quando se avalia a sensibilidade dos tecidos periféricos (TTI), é visto que o extrato aquoso de *H. sabdariffa* possui ação direta na captação da glicose pelos tecidos. Sob administração de insulina exógena, o extrato permitiu que os tecidos periféricos captassem mais facilmente a glicose (temos 0, 15 e 30 minutos) e ao final do teste permitiu um retorno glicêmico ainda mais preciso que o controle (tempo 60 minutos), como mostrado na Figura 3. Há uma série de fatores que podem influenciar na sensibilidade insulínica, desde a ligação do hormônio com o sítio ativo com o receptor até a ação dos segundos mensageiros intracelulares, incluindo o sistema de ancoragem do GLUT-4 na membrana plasmática (Campos et al., 2007). Portanto, este extrato pode influenciar em uma ou até mais vias, beneficiando a captação glicêmica.

Hibiscus sabdariffa surge no século XXI como uma planta fortemente promissora à tratamentos com distúrbios metabólicos, pois afeta em muitos aspectos o metabolismo lipídico. Estudos em ratos mostra que a associação deste tipo de tratamento fez com que fossem diminuídos os triglicerídios e LDL (Ubani et al., 2009; Fernández-Arroyo et al. 2011); ação hipolipidêmica e antioxidante em ratos diabéticos (Farombi & Ige, 2007; Yang et al. 2010); inibição da oxidação do LDL (Chang et al., 2006; Joven et al., 2014). Em humanos foi estudado que o uso deste extrato eleva os níveis de HDL em pacientes hipertensos (Mohagheghi et al., 2011); controle total da dislipidemia (diminuição de triglicerídios, colesterol e LDL, e aumento do HDL) em adolescentes obesos (Sabzghabae et al. 2013) e também apresenta efeito hipocolesterolêmico e fibras dietéticas presentes na semente deste vegetal (Hainida et al., 2008). Embora não tenham sido encontradas diferenças entre os valores protéicos e lipídicos séricos, nossos dados são corroborados por Fakeye et al. (2008), que também não obtiveram variações significativas nos valores do perfil lipídico de ratos tratados com o extrato aquoso de *H. sabdariffa*.

Dos parâmetros bioquímicos avaliados, apenas ALT mostrou uma queda em sua atividade (Tabela 2), mostrando uma função hepatoprotetora desta planta, na dose utilizada. Estudos anteriores demonstraram que os extratos de *H. sabdariffa* elevam a função das enzimas hepáticas (Akindahunsi e Olaleye, 2003; Alarcon-Aguilar et al., 2007; Fakeye et al., 2008), sem alterar a morfologia e fisiologia do fígado. Em contrapartida, Adeyemi et al. (2014) conseguiu restaurar níveis elevados de aspartato AST e ALT em ratos diabéticos tratados com *H. sabdariffa*.

As bases científicas para a afirmação de que as plantas medicinais e suas substâncias bioativas desempenham um papel importante na prevenção e no tratamento de doenças crônicas e degenerativas estão avançando continuamente. Nesse sentido, muitos estudos consideram que o *H. sabdariffa* poderia inclusive fazer parte da dieta alimentar da população, que assim poderia prevenir determinadas doenças. Investigações como essa são válidas para fornecer recomendações sobre o uso potencial do *H. sabdariffa* para o benefício da saúde pública. Certamente, mais estudos são necessários para comprovar que o vegetal é eficaz e seguro para o uso terapêutico.

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o tratamento de ratos com extrato aquoso de *H. sabdariffa* modificou positivamente o metabolismo bioquímico, diminuindo o ganho de peso corpóreo, sensibilizando os tecidos periféricos à insulina e também sendo hepatoprotetor aos animais.

5. Referências bibliográficas

Adeyemi, D.O., Ukwenya, V.O., Obuotor, E.M., Adewole, S.O. 2014. Anti hepatotoxic activities of *Hibiscus sabdariffa* L. in animal model of streptozotocin diabetes-induced liver damage. *Complementary and Alternative Medicine* 14, 1-11.

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* 109,388–393.

Akindahunsi, A. A., Olaleye, M. T. 2003. Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. Journal of Ethnopharmacology 89,161-164.

Al-Mamun, A., Khatun, M.H., Nessa, L., Islam, M.D., Munira, S. 2011. *In vitro* evaluation of the antibacterial, cytotoxic and insecticidal activities of *Hibiscus sabdariffa* fruits. Libyan Agriculture Research Center Journal Internation 3,144-149.

Alarcon-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M.D., Almanza-Perez, J.C., Romero-Nuñez, E., Campos-Sepulveda, E.A., Vazquez-Carrillo, L.I., Roman-Ramos, R. 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in msg mice. Journal of Ethnopharmacology 114.66–71.

Alarcón-Alonso, J., Zamilpa, A., Alarcón-Aguilar, F., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., Jimenez-Ferrer, E. 2012. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. Journal of Ethnopharmacology 139,751– 756.

Bernardis, L. L.; Patterson, B. D. 1968. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. Journal of Endocrinology 40, 527-528.

Bieski, I.G.C., Santos, F.R., Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O. 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012,1-36.

Campos, K. E., Sinzato Y.K., Damasceno, D.C., Rudge, M.V.C. 2006. Obesidade e resistência à insulina. Feminina 34,591-595.

Campos, K. E., Volpato, G.T., Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C, Damasceno, D.C. 2007. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. Life Sciences 81,1473-1478.

Campos, K. E., Volpato, G.T., Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C, Damasceno, D.C. 2008. Effect of obesity on rat reproduction and on development of their adult offspring. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 41, 22-125.

Cardoso, C.R.P., 2006. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae) [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Carvajal-Zarrabal, O., Hayward-Jones P.M., Orta-Flores, Z., Nolasco-Hipólito, Z., Barradas-Dermitz, D.M., Aguilar-Uscanga, M.G., Pedroza-Hernández, M.F. 2009. Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Dried Calyx Ethanol Extract on Fat Absorption-Excretion, and Body Weight Implication in Rats. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009, 1-5.

Chang, Y.C., Huang, K.X., 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 44,1015–1023.

D'Adamo E, Guardamagna O, Chiarelli F, Bartuli A, Liccardo D, Ferrari F, Nobili V. 2015. Atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk factors in obese children. Int J Endocrinol. 2015;2015:912047.

Fakeye, T.O., Pal, A., Bawankule, D.U., Yadav, N.P., Khanuja, S.P.S. 2008. Toxic Effects of oral administration of extracts of dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae). Phytotherapy Reserch 23, 412–416.

Faraji, M.H., Tarkhani, A.H.H. 1999. The Effect of Sour Tea (*Hibiscus sabdariffa*) on Essential Hypertension. Journal of Ethnopharmacology 65,231–236.

Farombi, E.O., Ige, O.O. 2007. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21,601–609.

Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Medina, I.C., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Research International* 44, 1490–1495.

França, I.S.X. et al. 2008. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev Bras Enf.* 61(2).

Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18, 499-502.

Gurrola-Díaz, D.M., García-López, P.M., Sánchez-Enríquez, S., Troyo-Sanromán, R., Andrade-González, L., Gómez-Leyva, J.F. 2010. Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract poder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine* 17,500–505.

Hainida, E., Ismail, A., Hashim, N., Mohd-Esa, N., Zakiah, A. Effects of defatted dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed powder on lipid profiles of hypercholesterolemia rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88,1043–1050.

Hernández-Bautista, R.J., Alarcón-Aguilar, F.J., Escobar-Villanueva, M.D.C., Almanza-Pérez, J.C., Merino-Aguilar, H., Fainstein, López-Díaz, N. E. 2014. Biochemical Alterations during the Obese-Aging Process in Female and Male Monosodium Glutamate (MSG) - Treated Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 11473-11494.

Joven, J., March, I., Espinel, E., Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Gallego, E., Aragone, G., Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., Rios, L., Martin-Paredero, V., Menendez, J.A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Camps, J. 2014. *Hibiscus sabdariffa* extract lowers blood pressure and improves endothelial function. Molecular and Nutrition Food Research 00, 1–5.

Millani, A. A. et al. 2010. Análise de crescimento e anatomia foliar da planta medicinal *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae) cultivada em diferentes substratos. Rev Bras Pl Med. Botucatu, 12(2):127-134.

Kim, M. S., Kim, J.K., Kim, H.J., Moon S.R., Shin, B.C., Park, K.W., Yang, H.O., Kim, S.M., Park, R. 2003. *Hibiscus* extract inhibits the lipid droplet accumulation and adipogenic transcription factors expression of 3T3-L1 preadipocytes. The Journal of Alternative and Complementary Medicine 9,499-504.

Kuo, C.H., Kao, E.S., Chan, K.E., Lee, H.J., Huang, T.F., Wang, C.J. 2012. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. Journal of Function Foods 4,375-381.

Lin, T.Z., Lin, H.H., Chen, C.C., Lin, M.C., Chou, M.C., Wang, C.J. 2007. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. Nutrition Research 27,140-145.

Luz, J., Pasin, V.P., Silva, D.J.M., Zemdegs, J.C., Amaral, L.S., Affonso-Silva, S.M. 2010. Effect of Food Restriction on Energy Expenditure of Monosodium Glutamate-Induced Obese Rats. Annal of Nutrition an Metabolism 56,31–35.

Mello, M. A. R, Souza, C.T., Braga, L.R., Santos, J.W., Ribeiro, I.A., Gobatto, C.A. 2001. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. Physiology, Chemical, Physical & Medicine 33, 63-71.

Mohagheghi, A., Maghsoud, S., Khashayar, P., Ghazi-Khansari, M. 2011. The effect of *Hibiscus Sabdariffa* on lipid profile, creatinine, and sérum electrolytes: a

Randomized Clinical Trial. International Scholarly Research Network Gastroenterology 2011,1-4.

Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A., Yeel, C.L. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extracts and potential exploitation of the seeds. Food chemistry 122:1055–1060.

Moura, R. A., Wada. C.S., Purchio, A., Almeida, T.V. 2002. Técnicas de Laboratório. São Paulo: Atheneu Editora, pp. 524.

Nemeroff, C.B.; Grant, L.B.; Bissette, G.; Ervin, G.N.; Harrell, L.E.; Prange, A.J.Jr. 1977. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. Psycho Neuroendocrinology. 2(2):79-97p.,

Neto, B.G.; Vasques, A.C.J.; Tambascia, M.A. 2011. Resistencia à insulina: como diagnosticar na prática clínica. In: Godoy-Matos, A.F. Endocardiometabologia na prática clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 5, 47-63 p.

Oliveira, F.R.; Lemos D. 2010. Obesidade e reprodução. Rev Feminina, 38:5p.

Nogueira, R. C., Cerqueira, H. F., Soares, M. B. P. 2010. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. Expert Opinion Ther 20,1-13.

Ojeda, D., Frerer, F.J., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., Alvarez, A. 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa* L. Journal of Ethnopharmacology 127;7–10.

Patel, S. 2014. *Hibiscus sabdariffa*: an ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. Biomedicine & Preventive Nutrition ;4,23–27.

Peng, C.H., Chyau, C.C., Chan, K.C., Chan, T.H., Wang, C.J., Huang, C.N. 2011. *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59,9901-9909.

Pinheiro, A. C. S. et al. 2011. Efeito do extrato aquoso de cabelo de milho (*Zea mays* L.) sobre a excreção renal de água e eletrólitos e pressão arterial em ratos Wistar anestesiados. Rev Bras Pl Med. Botucatu,13(4):375-381.

Quinn, R. 2005. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in peoples years? Nutrit, v. 21, n. 6, p.775-777.

Ribeiro, E. B., Marmo, M.R., Andrade, I.S., Dolnikoff, M.S. 1989. Effect of fasting of monosodium glutamate-obese rats. Brazilian Journal of Medical and Biology Research 22,919-921.

Ruiz, A.L.T.G., Taffarello, D., Souza, V.H.S., Carvalho, J.E. 2008. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. Revista Brasileira de Farmacognosia 2, 295-300.

Simões, C.M.O., 2007. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 1ª edição. Editora da UFRGS, Porto Alegre; Editora da UFSC, Florianópolis, pp.13-29.

Tai MM. 1994. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. Diabetes Care 17, 152-154.

Tsai, P.J., McIntoshb, J., Pearceb, P., Camdenb, B., Jordanc, B.P. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Research International 35, 351–356.

Valerio, G.; Licenziati, M.R.; Iannuzzi, A.; Franzese, A.; Siani, p.; Riccardi, G.; Rubba, P. Insulin resistance and impaired glucose tolerance in obese children and

adolescents from Southern Italy. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 16(4):279-284p., 2006.

Volpato, G. T., Damasceno, D.C., Calderon, I.C.P. Rudge, M.V.C. 2002. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 4, 35-45.

Tseng, T.H., Hsu, J.D., Lo, M.H., Chu, C.Y., Chou, F.P., Huang, C.L., Wang, C.J. 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 35,1159-1164.

Vieira, S. 1997. Outros delineamentos. In: *Acta Cirúrgica Brasileira*. [serial online], Estatística Experimental, Atlas, São Paulo, 119-132.

Wilckelgren, I. 1988. Obesity: how big a problem? *Science* 280,1364-1367.

YOUNG, D.S. et al. 2001. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, AACCC Press, 4.ed.

Zhang, N., Huan, Y., Huang, H., Song, G.M. Sun, S., Shen, Z. 2010. Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta Pharmacologica Sinica* 31,35–42.

Tabela 1. Média e desvio-padrão do Índice de Lee inicial (dia 70) e final (dia 85) do tratamento e ganho de peso corpóreo em ratos obesos com tratamento diário de água (C) e ratos obesos com tratamento diário de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* a 400mg/Kg (HS).

	C (n=10)	HS (n=16)
Índice de Lee - dia 70	0,269±0,015	0,270±0,016
Índice de Lee – dia 85	0,274±0,015	0,0281±0,07
Ganho de peso corpóreo (g)	54,2±8,3	37,9±9,1*

*p<0,05 – diferença significativa ao Grupo C. Teste t de Student.

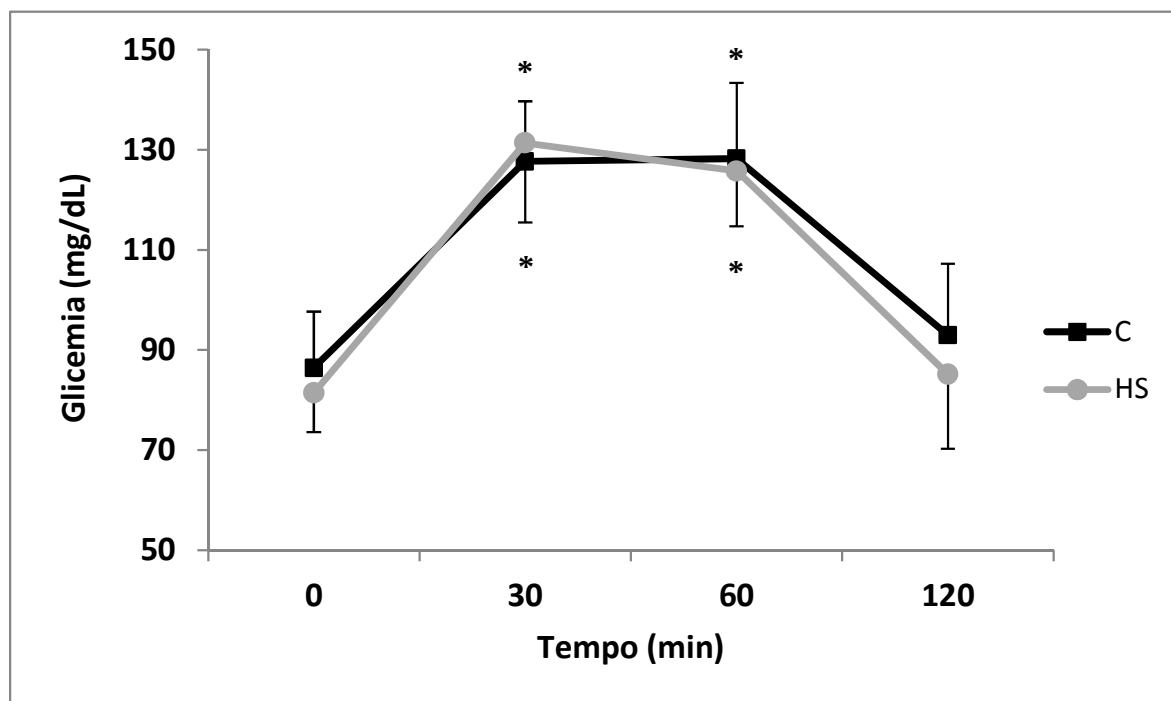


Figura 1. Valores glicêmicos do Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) em ratos com tratamento diário de água (grupo C) e ratos obesos com tratamento diário de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* a 400mg/Kg (grupo HS).

* $p < 0,05$ – diferença significativa ao tempo de jejum (0 minutos). Teste t de Student

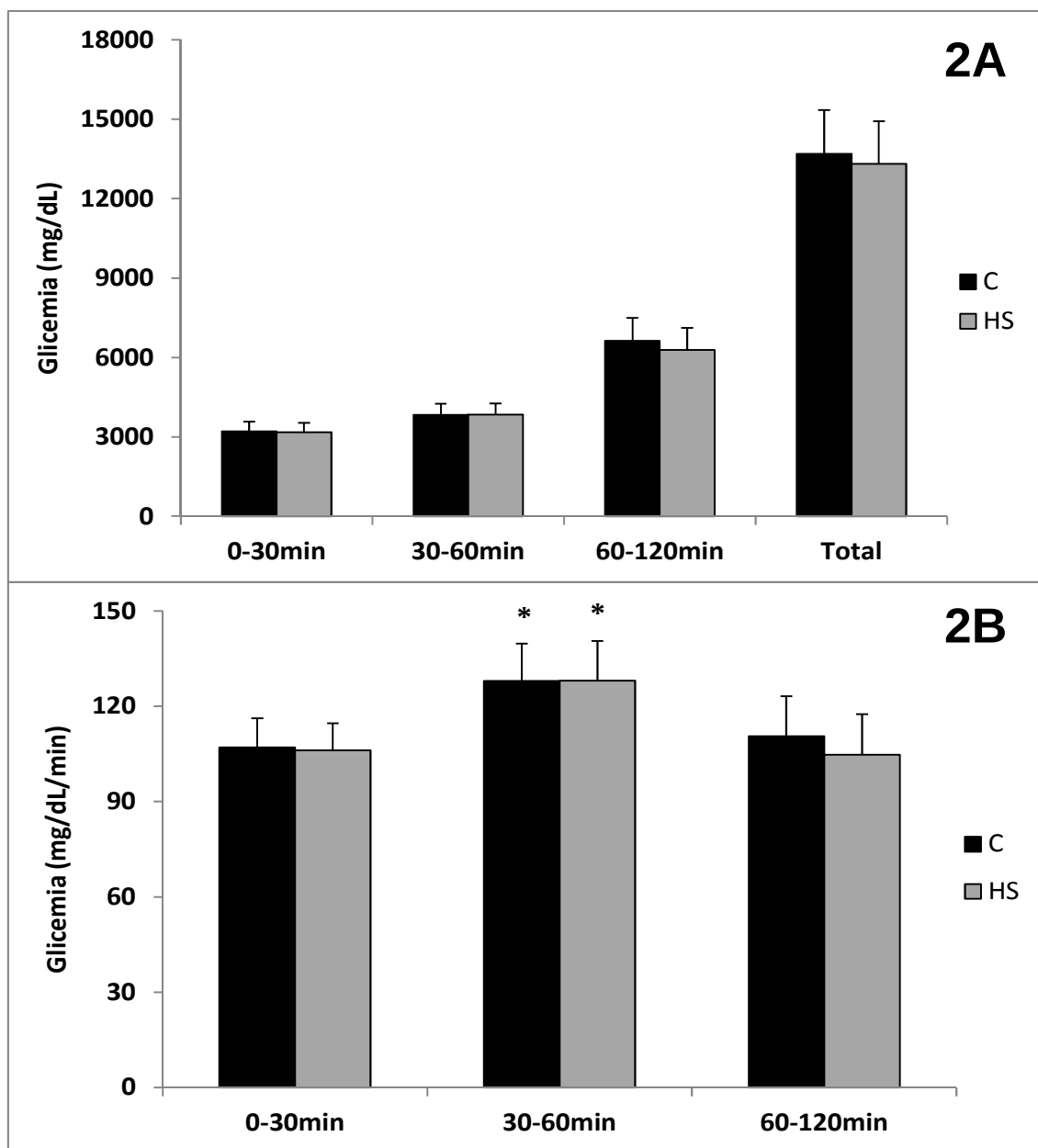


Figura 2. Áreas parcial e total sob a curva do Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (**Figura 2A**) e média glicêmica de cada intervalo de tempo (**Figura 2B**) em ratos com tratamento diário de água (grupo C) e ratos obesos com tratamento diário de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* a 400mg/Kg (grupo HS).

*p<0,05 – diferença significativa ao intervalo 0-30min. Teste t de Student

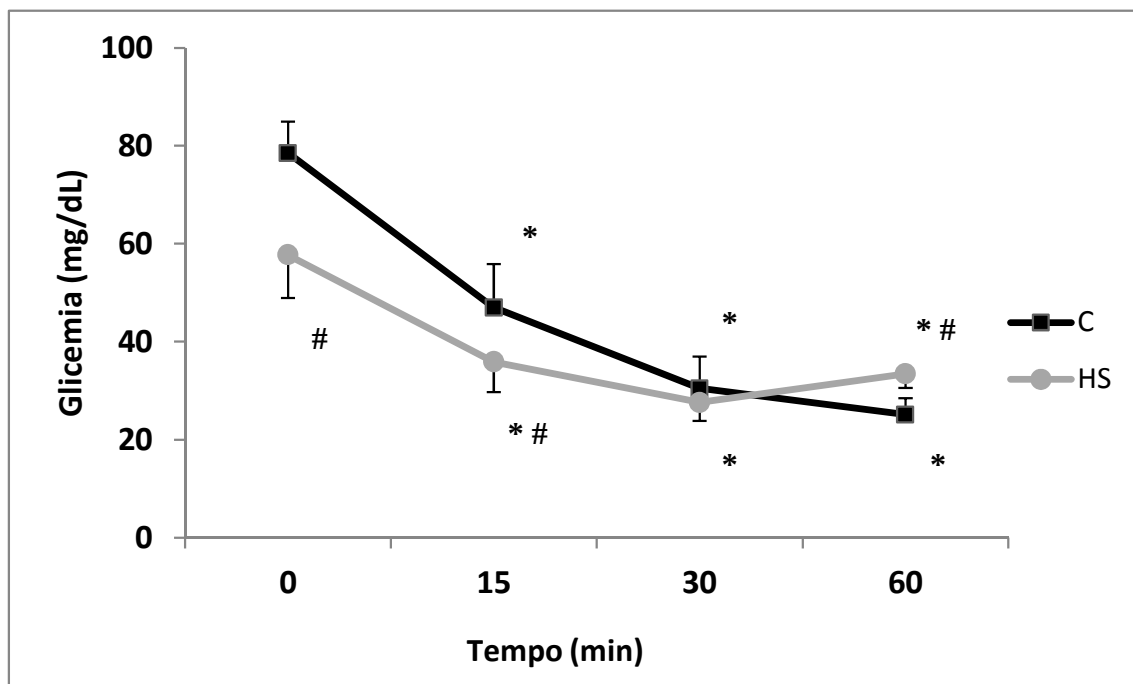


Figura 3. Valores glicêmicos do Teste de tolerância à insulina (TTI) em ratos com tratamento diário de água (grupo C) e ratos obesos com tratamento diário de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* a 400mg/Kg (grupo HS).

* $p < 0,05$ – diferença significativa ao tempo de jejum (0 minutos). Teste t de Student.

$p < 0,05$ – diferença significativa ao grupo C. Teste t de Student.

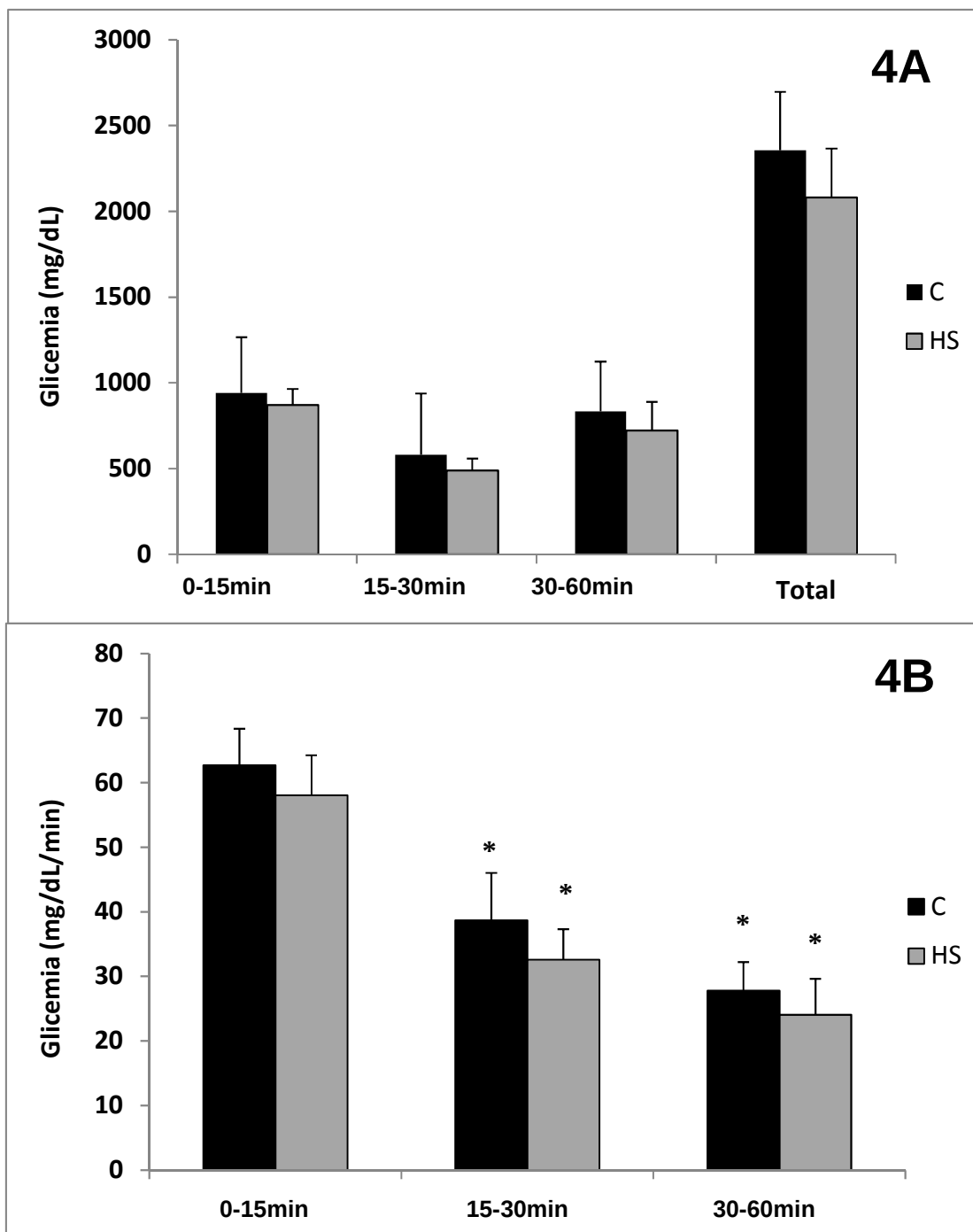


Figura 4. Áreas parcial e total sob a curva do Teste oral de tolerância à insulina (TTI) (**Figura 4A**) e média glicêmica de cada intervalo de tempo (**Figura 4B**) em ratos obesos com tratamento diário de água (C) e ratos obesos com tratamento diário de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* a 400mg/Kg (HS).

* $p < 0,05$ – diferença significativa ao intervalo 0-15min. Teste t de Student.

Tabela 2. Média e desvio-padrão dos biomarcadores bioquímicos sérico (proteínas totais, albumina, globulina, colesterol total, triglicerídios, lipoproteínas HDL e VLDL, alanino aminotransferase e aspartato aminotransferase) de ratos com tratamento diário de água (grupo C) e ratos obesos com tratamento diário de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* a 400mg/Kg (grupo HS).

	C (n=10)	HS (n=16)
<i>Proteínas totais (g/L)</i>	6,5±0,5	6,4±0,2
<i>Albumina (g/L)</i>	3,2±0,2	3,1±0,1
<i>Globulina (g/L)</i>	3,3±0,4	3,3±0,2
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	58,3±9,7	55,8±23,7
<i>Triglicerídios (mg/dL)</i>	121,0±27,2	141,8±36,6
<i>HDL (mg/dL)</i>	47,8±6,4	47,2±7,5
<i>VLDL (mg/dL)</i>	24,2±5,5	28,4±7,3
<i>ALT (U/L)</i>	184,5,7±19,0	145,1±20,0*
<i>AST (U/L)</i>	59,4±12,8	57,7±9,6

*p<0,05 – diferença significativa ao Grupo C+HS. Teste t de Student.

ARTIGO II

ANTIGENOTOXIC EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF *Hibiscus sabdariffa* L. IN RATS NEONATALLY TREATED WITH MONOSODIUM GLUTAMATE

Ana Carla Guidini Valentini Gheller¹, Marina Mariko Sugui¹, Kleber Eduardo de Campos²

¹Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop. ²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop. ³Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus do Araguaia.

OBS.: O presente artigo será traduzido para a língua inglesa e submetido em breve ao periódico *Planta Medica*. Instruções para os autores em anexo.



CORRESPONDÊNCIA:

Ana Carla Guidini Valentini Gheller. Universidade Federal de Mato Grosso. *Campus* Universitário de Sinop. Av. Alexandre Ferronato nº 1200. Setor Industrial. Sinop/MT. E-mail: anacarlagv@hotmail.com. Phone: +55 66 9292.1172

RESUMO

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta da família Malvaceae, conhecida popularmente como vinagreira. Suas flores fornecem uma bebida consumida mundialmente. Dentre os efeitos terapêuticos do *H. sabdariffa* estão: antioxidante, hipocolesterolemiantes, anti-obesidade, redutor da resistência à insulina, anti-hipertensivo, quimiopreventivo para câncer de pele, diurético e uricosúrico. Os benefícios nutricionais da planta estão ligados à biodisponibilidade de flavonoides, em especial às antocianinas. O trabalho avaliou os efeitos do extrato aquoso de *H. sabdariffa* contra danos induzidos ao DNA pela ciclofosfamida (CPA, 25 mg/Kg), em ratos machos Wistar através o Teste do Micronúcleo. As amostras dos cálices de *H. sabdariffa* foram obtidas no município de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. O extrato aquoso foi preparado em forma de infusão e cada animal recebeu, diariamente, a dose de 400mg/kg, via gavagem, durante 15 dias consecutivos de tratamento. A presença de antocianinas foi confirmada pelo teste com cloreto férrico e a presença de compostos fenólicos foi admitida através de cromatografia líquida de alta eficiência, com destaque para a identificação da rutina. Os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia para obtenção da medula óssea e determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEs). O grupo tratado com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* revelou 91% de redução da frequência de micronúcleos quando comparado ao grupo controle positivo. O que nos permite dizer que, nas condições testadas, o *H. sabdariffa* L. apresentou efeito protetor aos danos induzidos pela CPA ao DNA dos animais tratados, sendo um potencial candidato a agente de prevenção contra a carcinogênese.

PALAVRAS-CHAVE: Ciclofosfamida; Quimioprevenção; Teste do Micronúcleo, *Hibiscus sabdariffa*, ratos.

Introdução

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta da família Malvaceae. Um arbusto vigoroso, capaz de atingir até 3 metros de altura, com caule verde ou avermelhado. Suas folhas são alternadas, lobadas e dentadas, com coloração verde ou púrpura. As flores são branco-amareladas, rosas ou púrpuras, com cálices carnosos vermelhos ou brancos que formam os frutos [1]. É uma planta tropical nativa da Índia e Malásia, embora cresça amplamente em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios [2]. Os benefícios nutricionais da planta estão ligados à biodisponibilidade de flavonoides, em especial às antocianinas [3,4,5].

Dentre os efeitos terapêuticos do *H. sabdariffa* já discutidos na literatura estão: antioxidante [4,6], hipocolesterolemizante [7,8,9]; anti-obesidade [9,10] redutor da resistência à insulina [9], anti-hipertensivo [11,12,13]; quimiopreventivo para câncer de pele [14], diurético [15], uricosúrico [16], antimicrobiano e citotóxico [17]. Pode-se destacar ainda o uso do *H. sabdariffa* como: sudorífico, laxante leve, sedativo, no tratamento de pedra nos rins e tratamento de lesão hepática [18].

As propriedades terapêuticas do *H. sabdariffa* se devem à presença de compostos fenólicos, produtos do metabolismo secundário desse vegetal, conhecidos pelo potencial antioxidante [19]. Olaleye [20] encontrou glicosídeos cardíacos, flavonoides, saponinas e alcaloides no extrato aquoso de *H. sabdariffa*. Enquanto um estudo fitoquímico demonstrou que fenóis, alcaloides, taninos, flavonoides e saponinas estão presentes nas folhas, caule e na raiz da planta, sendo que os alcaloides estão presentes em todas as partes da planta [21].

Os antioxidantes são substâncias capazes de interferir na formação e propagação de radicais livres. Uma grande variedade de substâncias fenólicas, especialmente aqueles presentes nas plantas alimentares e medicinais, tem sido considerada como adjuvantes na prevenção de efeitos genotóxicos. A maioria destes compostos fenólicos que ocorrem naturalmente possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que parecem contribuir para a sua atividade protetora dos danos ao DNA [19].

Substâncias conhecidas como quimiopreventivas são aquelas capazes de inibir, retardar ou reverter a carcinogênese em várias fases [8]. As antocianinas tem ação antioxidante e, portanto, são capazes de combater processos mutagênicos [5].

Atualmente, a mutagenicidade se tornou, de maneira crescente, alvo de avaliação científica no Brasil e no mundo. A relevância desta observação foi devido à associação entre mutação e câncer. Mutações são definidas como alterações no DNA (ácido desoxirribonucléico) celular, podendo envolver mutações cromossômicas e gênicas, relacionadas de maneira significativa com a carcinogênese [22]. Dados do Ministério da Saúde apontam que em 2011, 181.575 pessoas morreram por consequência de neoplasias malignas [23]. Tendo em vista que a mutação é um dos eventos iniciadores do câncer, pode-se dizer que o combate ou a prevenção de eventos mutagênicos é um dos caminhos a serem desenvolvidos na tentativa de prevenir danos ao material genético [24].

Segundo a Organização Mundial da Saúde [25] a obesidade e o sobrepeso são definidos como acúmulo de gordura anormal ou excessivo, oriundos de um distúrbio metabólico severo. No Brasil, em 2012, 50,6% da população adulta apresentava excesso de peso [23]. Tal condição representa um risco para a saúde, sendo um grave problema nutricional, que aumenta o risco de morbidade de várias patologias metabólicas e crônicas, entre estas as neoplasias [26].

Segundo Lippman e Hong [27], pesquisas de prevenção devem integrar cada vez mais estudos genômicos com estudos relacionados aos fatores ambientais, estilo de vida e dieta. A prevenção e o controle do câncer exigem um grande comprometimento dos setores de saúde, já que o aumento no número de novos casos exige recursos financeiros e humanos para gerir as necessidades de diagnóstico, tratamento e acompanhamento dessa patologia [23].

O conhecimento tradicional é uma importante fonte de obtenção de novos fitoterápicos. Um levantamento etnobotânico realizado por Bieski et al [28], em um distrito da cidade de Poconé, Mato Grosso, Brasil, apresentou o *H. sabdariffa* como uma das plantas de maior relação de importância de uso medicinal, o que sugere que a mesma é largamente utilizada na região. De acordo com Ruiz et al. [29], ainda hoje surgem novas plantas como possíveis fontes de novas drogas. Porém, o uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar uma planta como um medicamento fitoterápico, pois a falta de informações seguras sobre suas

propriedades, reações adversas, ação sinérgica e toxicidade são fatores preocupantes quanto à automedicação [30].

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do *H. sabdariffa* contra danos induzidos ao DNA em ratos machos Wistar obesos através o teste do micronúcleo.

Resultados

O teste para identificação de antocianinas foi positivo, gerando uma coloração verde acentuada. A CLAE nos permitiu identificar a rutina na leitura em 254nm (A) e em 360nm (C), composto confirmado após o processo de co-injeção (B), além de sugerir a presença de outros compostos fenólicos no extrato analisado (Figura 1).

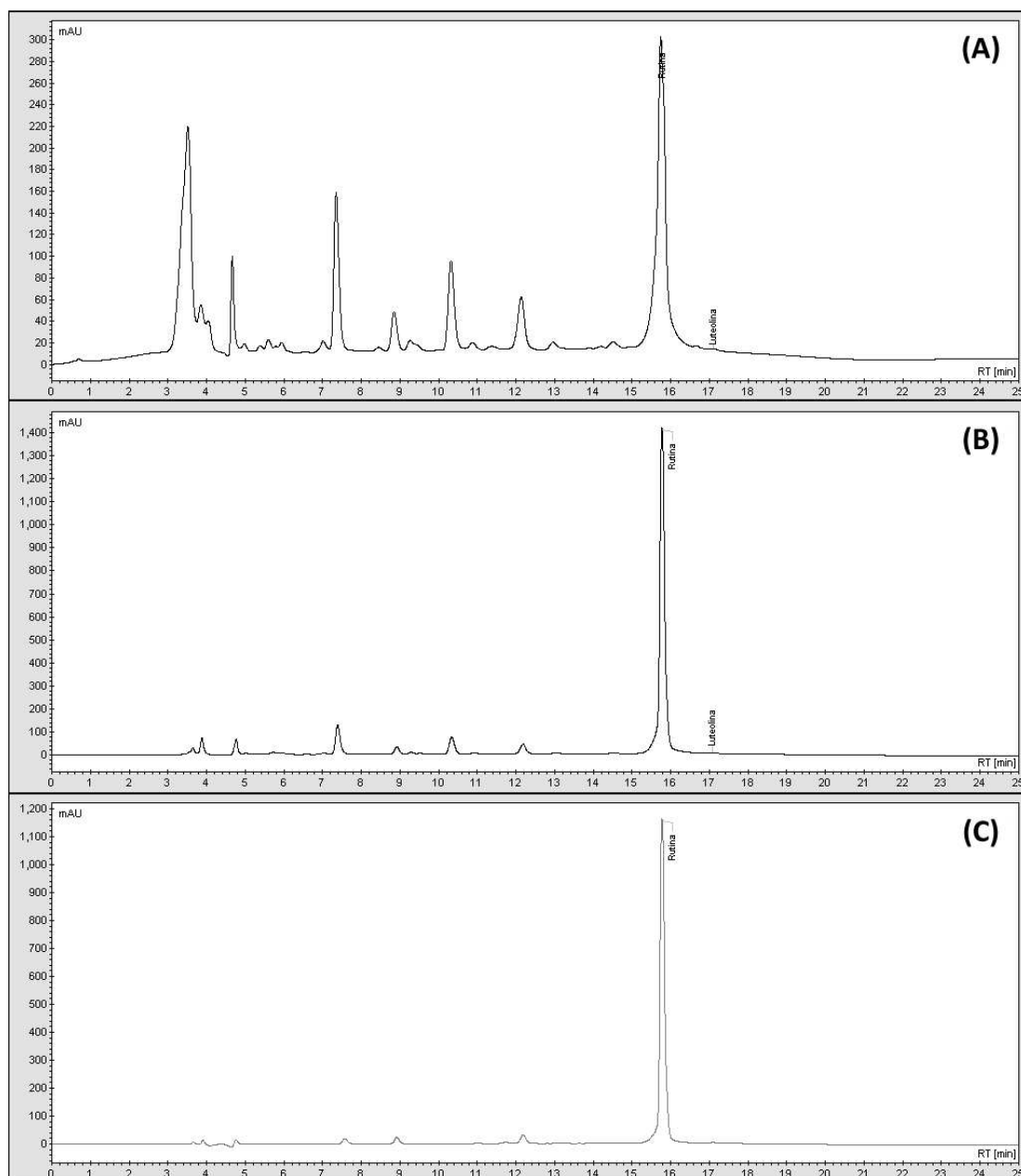


Figura 1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa*. (A) Rutina, RT= 15,74 min a 254 nm, (B) Co-injeção de padrão rutina, RT = 15,78 min a 254nm e (C) Rutina, RT= 15,74min a 360 nm.

A Tabela 1 apresenta os efeitos do *H. sabdariffa* sobre danos ao DNA, quimicamente induzidos pela ciclofosfamida em ratos pré-tratados com o extrato aquoso. Os resultados mostram que o grupo tratado com o extrato aquoso do *H. sabdariffa* e ciclofosfamida, reduziram em 91% ($p < 0,001$) a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea, quando comparado com o grupo controle positivo. Verifica-se também que grupo tratado somente com o *H. sabdariffa* não apresentou potencial mutagênico quando comparado com o grupo controle negativo.

Tabela 1. Frequência de micronúcleo em eritrócito policromático (MNPCEs) em medula óssea de ratos Wistar, após pré-tratamento com extrato aquoso de *H. sabdariffa* e ciclofosfamida (CPA).

Tratamento	N° de células analisadas	MNPCEs		% de Redução
		N°	%	
Água + NaCl 0,9% ^a	10.000	83	0,83	
Água + CPA (25mg/Kg) ^b	10.000	128	1,28	
<i>H. sabdariffa</i> L. + CPA (25mg/Kg)	16.000	87	0,87	91*
<i>H. sabdariffa</i> L. + NaCl 0,9%	16.000	60	0,60	

^a Controle negativo; ^b Controle positivo; *p<0,001. Teste qui-quadrado.

Na Tabela 2 estão alocados os dados referentes ao peso corpóreo inicial e final dos ratos, bem como o ganho de peso dos animais durante o período de tratamento. Pode-se avaliar que os ratos tratados com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* L. tiveram um ganho de peso menor em relação aos grupos controle.

Tabela 2 - Peso corpóreo médio (g) e ganho de peso (média ± SD) de ratos tratados durante 15 dias com extrato aquoso de *H. sabdariffa*.

Tratamento	N° de animais	Peso inicial (g) X±SD	Peso final (g) X±SD	Ganho de peso (g) X±SD
Água + NaCl 0,9% ^a	5	220,37±32,66	273 ± 28,63	48,4 ± 23,98
Água + CPA (25mg/Kg) ^b	5	201,87±37,79	273 ±4,47	60 ±32,59
<i>H. sabdariffa</i> L. + CPA (25mg/Kg)	8	203,11±26,26	236,25 ±28,75	35,52 ±10,83
<i>H. sabdariffa</i> L. + NaCl 0,9%	8	207,87±31,74	248,12 ±38,53	40,25 ±27,44

^a Controle negativo; ^b Controle positivo. Média e desvio padrão.

A Tabela 3 apresenta o consumo médio de ração de cada animal durante o período experimental. De acordo com os dados, os grupos tratados com o *H. sabdariffa* L. não mostraram diferença significativa em relação ao consumo de ração quando comparados com o grupo controle negativo.

Tabela 3 - Consumo médio de ração e *H. sabdariffa* (peso seco) por ratos tratados durante 15 dias com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* ou água.

Tratamento	Nº de animais	Peso corpóreo (g) X±SD	Consumo da <i>H. sabdariffa</i> (mg/animal/dia)	Consumo da ração (g/dia/animal) X±SD
Água + NaCl 0,9% ^a	5	248,8 ± 29,82	-	22,01 ± 3,43
Água + CPA (25mg/Kg) ^b	5	243 ± 34,69	-	24,30± 2,55
<i>H. sabdariffa</i> L. + CPA (25mg/Kg)	8	218,43±25,55	87,37	22,88 ± 1,42
<i>H. sabdariffa</i> L. + NaCl 0,9%	8	228 ± 30,42	91,20	20,87± 2,21

^a Controle negativo; ^b Controle positivo. Média e desvio padrão.

Discussão

Atualmente, a busca por substâncias com propriedades anticâncer de derivados de plantas, constituintes da dieta, tem um papel importante na prevenção da doença. Muitos compostos presentes em produtos naturais são considerados agentes quimiopreventivos, ou seja, substâncias capazes de agir contra a toxicidade ao material genético e, conseqüente a carcinogênese. Segundo Lin et al [8] o extrato aquoso de *H. sabdariffa* apresenta propriedades quimiopreventivas que podem contribuir para as ações anticâncer da planta.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o uso do *H. Sabdariffa*, como planta medicinal, traz benefícios relacionados à quimioprevenção de danos ao DNA e conseqüente prevenção do câncer. O extrato aquoso do *H. Sabdariffa* reduziu em 91% os danos induzidos pela CPA em células de medula óssea de ratos machos Wistar quando comparado ao grupo controle positivo.

Adetutu e colaboradores [31] realizaram o teste do micronúcleo em camundongos utilizando arsenito de sódio como indutor da mutagenicidade. Os animais foram tratados com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* durante 7 dias com diferentes concentrações: 50, 100 e 150 mg/kg/dia. O extrato apresentou potencial

protetor contra os danos induzidos pelo agente químico, sendo o melhor resultado encontrado na concentração de 100mg/kg/dia do extrato.

Rosa e colaboradores [32] observaram potencial antígeno-tóxico e antimutagênico do extrato metanólico de *Hibiscus tiliaceus*, planta que pertence ao mesmo gênero do *H. sabdariffa*, contra a mutagênese oxidativa induzida por peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de tertbutila em fibroblastos de pulmão de hamster chinês em cultura (células V79), utilizando o ensaio cometa e teste de micronúcleos. Os resultados mostraram redução do índice de danos ao DNA no ensaio cometa e também diminuição do efeito mutagênico dos agentes testados, verificado pela redução da taxa de micronúcleos.

Hamid et al [33] identificaram atividade antígeno-tóxica de extrato aquoso de *H. sabdariffa* em células de medula óssea de camundongos ICR contra danos ao DNA induzidos por peróxido de hidrogênio através do ensaio cometa. As células foram pré-tratadas por 24 horas com 500 e 1000 ng/mL do extrato e mostraram significativa proteção contra os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

Olvera-Garcia e colaboradores [34] observaram atividade antimutagênica do extrato aquoso de *H. Sabdariffa* contra a mutagenicidade do 1-nitropireno (1-NP) através do Teste de Ames modificado e não mostrou atividade genotóxica por não induzir fragmentação do DNA em gel de eletroforese.

Alguns estudos relatam as propriedades quimiopreventivas do *H. sabdariffa* por outros mecanismos de ação. Lin et al [8], avaliaram a indução de apoptose do extrato aquoso de *H. sabdariffa* contra células de câncer gástrico, concluindo que o mesmo pode ser utilizado como agente quimiopreventivo. Lin e colaboradores [35] testaram a viabilidade de células de câncer de próstata frente à exposição com extrato aquoso de *H. sabdariffa*. O estudo mostrou efeito inibitório sobre o crescimento celular de maneira dose dependente, houve inibição de 50% da viabilidade das células cancerígenas.

Adaramoye e colaboradores [36] observaram que o extrato metanólico de *H.sabdariffa* mostrou resultados protetores frente à exposição à radiação usada no tratamento de neoplasias. O estudo realizado expôs ratos Wistar machos, tratados com *H. sabdariffa*, à radiação e concluiu que o consumo da planta pode ser um excelente fator de proteção contra os danos induzidos pela radiação ao sistema antioxidante.

Dessa maneira, os efeitos quimiopreventivos observados nos estudos com o *H. sabdariffa* provavelmente estão relacionados às substâncias antioxidantes que o mesmo contém. A análise cromatográfica (CLAE, fig. 2) do extrato aquoso confirmou que compostos fenólicos, conhecidamente antioxidantes, estavam presentes na infusão consumida pelos animais. Dentre eles podemos destacar as antocianinas, confirmadas através do teste de identificação com cloreto férrico e a rutina, identificada por meio da CLAE e confirmada após co-injeção de padrão.

Rodriguez-Medina e colaboradores [5] realizaram uma caracterização química do extrato aquoso de *H. sabdariffa* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual apresentam a descrição de 17 compostos fenólicos. As antocianinas são os compostos fenólicos de maior concentração do extrato aquoso de *H. sabdariffa* [13,37].

De acordo com os estudos, o extrato aquoso do *H. sabdariffa* mostrou presença de antocianinas. A presença desses compostos no extrato é reforçada em razão da intensa coloração roxa apresentada [5,15].

A análise cromatográfica (CLAE) realizada por Beltrán-Debón et al [38], nas quais os primeiros picos a surgir no cromatograma foram identificados como sendo ácido hidroxicítrico, ácido hibisco e ácido clorogênico, apresentou perfil semelhante ao cromatograma apresentado em nossos resultados. Há possibilidade de que o cromatograma obtido nesse trabalho também apresente as mesmas substâncias, pois como visto nos cromatogramas (A), (B) e (C) há picos não identificados com baixo tempo de retenção e concentração considerável.

A quantificação de antocianinas realizada por Showande et al [39], resultou na concentração de $0.583 \text{ g} \pm 0.13$ a cada 100 g de extrato aquoso dos cálices de *H. sabdariffa*. No estudo de Alarcón-Alonso et al [15], a concentração de antocianinas no extrato foi de 77,3 mg/g, de quercetina foi de 3,2mg/g, de rutina foi de 2,1 mg/g e de ácido clorogênico foi de 2,7mg/g.

Sildi et al [40], isolaram quatro tipos de antocianinas do extrato aquoso de *H. sabdariffa*. A relação entre a atividade antioxidante e concentração de antocianinas obtidas dos cálices de *H. sabdariffa*, foi determinada por Tsai et al [4], que concluíram que a capacidade antioxidante do extrato aumenta de maneira linear, conforme aumenta a quantidade de pétalas utilizadas no preparo do extrato e tempo de extração.

Entretanto, devido à ausência de padrões analíticos, somente foi possível confirmar a identidade da rutina no estudo, mas pode-se sugerir que haja outros compostos fenólicos no cromatograma, considerando as condições de análise propícias para o isolamento dos mesmos. Lin e colaboradores [35], também isolaram rutina no extrato aquoso de *H. sabdariffa*.

O estudo de Olvera-Garcia e colaboradores [34], mostrou que o extrato aquoso de *H. sabdariffa* submetido a CLAE apresentou maior concentração de substâncias quando comparado aos extratos clorofórmico e etílico investigados nas mesmas condições, o que sugere que muitos compostos são extraídos preferencialmente em solução aquosa.

A atividade antioxidante do extrato de *H. sabdariffa* foi avaliada por Tseng et al [14], pela sua capacidade de extinção de 1-difenil-2 - picrilhidrazil (DPPH) livre e inibição da atividade da xantina oxidase (XO). O extrato apresentou capacidade de combate a radicais livres e mostrou um forte efeito inibitório na atividade da XO. Os autores também testaram a bioatividade antioxidante destes extratos usando um modelo de terc - butil- hidroperóxido (t - BHP), capaz de induzir danos oxidativos em hepatócitos primários de rato. Os resultados mostram o potencial do extrato de *H. sabdariffa* em proteger hepatócitos de rato da citotoxicidade induzida por t-BHP e genotoxicidade por diferentes mecanismos.

Foram observados efeitos hepatoprotetores contra fibrose hepática crônica induzida por produtos químicos *in vivo*, intimamente associados com o poder antioxidante do *H. sabdariffa* [41]. Também Liu et al. [42] demonstraram o efeito hepatoprotetor em ratos após exposição dos animais ao acetaminofeno (paracetamol). Os animais tratados com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* obtiveram redução do estresse oxidativo e da morte celular hepática.

Um estudo realizado por Ademiluyi e colaboradores [43] investigou o efeito protetor do *H. sabdariffa* sobre a nefrotoxicidade e estresse oxidativo em ratos. A comparação dos grupos mostrou que o consumo de dietas suplementadas com o extrato protege os rins e atenua o estresse oxidativo por meio da modulação de antioxidantes, especialmente as antocianinas.

Em relação à toxicidade do *H. sabdariffa*, de acordo com os resultados obtidos, o extrato aquoso de *H. sabdariffa* não apresentou ação mutagênica quando comparado os animais tratados somente com o *H. sabdariffa* ao grupo controle.

Chewonarin et al. [44] também observaram que o *H. sabdariffa* não é indutor de mutagenicidade quando realizado estudo através do teste de mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

Por outro lado, Takeda e Yasui [45] relataram a mutagenicidade do *H. sabdariffa*, sugerindo a quercetina o composto responsável pela ação mutagênica. Montero et al [46] identificaram ação genotóxica de *Hibiscus elatus Sw* em medula óssea de roedores através do Teste de micronúcleo. Dajori et al [47] observaram genotoxicidade do extrato de *Hibiscus acetosella* em sangue periférico e tecido hepático de camundongos *Swiss* através do ensaio cometa.

Olaleye [20] identificou que *H. sabdariffa* foi tóxico para *Artemia salina* com CL50 de 55,1 ppm. Al-Mamun et al. [17] também observaram efeitos citotóxicos do extrato aquoso de *H. sabdariffa* em *Artemia salina*, utilizando como controle positivo o sulfato de vimblastina. Orisakwe e colaboradores [48] indentificarm que o extrato aquoso do cálice de *H. sabdariffa* induz toxicidade testicular em ratos.

Estudos preliminares sugerem atividade antitumoral do extrato aquoso de *H. sabdariffa* estudado, pois foram observados efeitos citotóxicos em células de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) tratadas com concentrações de 1 mg/mL, 05 mg/mL e 0,25 mg/mL do extrato. Olvera-Garcia e colaboradores [34] observaram também atividade citotóxica em células de carcinoma cervical humano (HeLa) *in vitro*.

Muitos estudos relatam os efeitos farmacológicos do *H. sabdariffa* como anti-obesidade [10,49]. Diante dos resultados apresentados, os grupos tratados com o extrato aquoso de *H. sabdariffa* mostraram um ganho de peso menor quando comparado ao grupos controles. Alarcon-Aguilar et al. [10] usaram o MSG como indutor de obesidade e observaram redução significativa do ganho de peso de animais tratados com 120mg/kg/dia do extrato aquoso de *H. sabdariffa*. Iyare et al. [50] realizaram o controle de peso em ratos não obesos tratados com extrato aquoso de *H. sabdariffa* e observaram um ganho de peso menor em relação ao controle negativo.

Perez-Torres et al [51] indicam o uso terapêutico do extrato do *H. sabdariffa* em pacientes com síndromes metabólicas devido a ação de polifenóis. Peng et al [52] identificaram o efeito protetor de polifenóis do extrato do *H. sabdariffa* contra a Diabetes tipo II em modelo animal na dose de 200 mg/Kg. Por outro lado, futuros

estudos relacionando *H. sabdariffa* e desordens metabólicas devem ser realizados, bem como em relação ao seu uso contra outras doenças.

Em conclusão, nas condições experimentais realizadas, o *H. sabdariffa* L. apresentou potencial quimioprotetor contra danos ao DNA, provavelmente contribuindo com o combate aos radicais livres. De acordo com Ferreira [53], a atividade quimioprotetora ao DNA pode estar associada aos compostos fenólicos que agem como potenciais agentes antimutagênicos, devido sua ação antioxidante.

Evidências experimentais que correlacionam à ingestão de *H. sabdariffa* L. e frequência de mutação são, ainda, muito limitadas. Por outro lado, o estudo mostrou que o *H. sabdariffa* L. contém compostos antimutagênicos, os quais indicam ter um potencial quimiopreventivo contra substâncias genotóxicas e, consequentemente a carcinogênese.

Além disso, o estudo mostrou resultados satisfatórios sobre o uso do extrato aquoso do *H. sabdariffa* no controle de peso corporal. Porém, o seu consumo deve ser realizado com cautela, visto que ainda há muitos efeitos terapêuticos do *H. sabdariffa* a serem investigados.

Materiais e Métodos

Animais

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)/UFMT pelo número de protocolo 23108.705702/13-9. Foram utilizados ratos machos Wistar que tiveram a obesidade induzida através do tratamento com glutamato monossódico de acordo com o protocolo de Campos et al [54] A confirmação da obesidade foi determinada pelo Índice de obesidade de Lee [55].

Durante o período experimental, os animais permaneceram no Biotério do LiPeQ/UFMT/Sinop, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz (12 horas claro/escuro), exaustão, recebendo ração comercial peletizada e água filtrada *ad libitum*.

Agente químico

A ciclofosfamida (CPA) é um agente alquilante que age bloqueando a duplicação do DNA. Trata-se de uma substância citotóxica utilizada no tratamento de neoplasias. É inativa até ser metabolizada no fígado pelas oxidasas de função mista do P450. Pode ser usada também como imunossupressora [56].

No presente trabalho a CPA utilizada foi diluída em solução salina 0,9% e administrada aos animais intraperitonealmente, na concentração de 25 mg/kg p.c. de acordo com Delmanto et al. [55].

Preparação do extrato

As amostras dos cálices de *H. sabdariffa* foram obtidas no município de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. A exsicata da planta está no Jardim Botânico de Brasília, sob registro HEPH5633. Uma infusão foi preparada, com os cálices já secos, na proporção de 15,0 g de extrato seco para cada 100 mL de água. A infusão foi filtrada e uma amostra de 5,0 mL foi levada a evaporação em estufa, para determinação do peso seco. Cada animal recebeu diariamente a dose de 400mg/kg, via gavagem, durante o tratamento.

Identificação de antocianinas

O teste foi baseado na metodologia de Mouco e colaboradores [57], na qual o composto flavonoidico presente na amostra, em presença de cloreto férrico desenvolve coloração que pode variar entre verde, amarelo-castanho e violeta. Para verificação da presença desses compostos, foram adicionadas duas gotas de cloreto férrico a 2,5 % a uma alíquota de 1,0 mL do extrato bruto concentrado.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As soluções para análise da CLAE foram preparadas na concentração de 10 mg.mL⁻¹ em água ultrapurificada e filtradas em filtro Millex® com tamanho de poro de

0,45 µm. Foram realizados ensaios cromatográficos em sistema de CLAE Varian Pro Star 325 LC plus detector de UV, com sistema de comprimento de onda duplo. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250,0 mm x 4,6 mm, 5µm). A fase móvel consistiu em solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1% em volume (eluente A) e acetonitrila (eluente B), com o seguinte gradiente de eluição: 0-10 min, 10% de B; 10-11 min, 20% de B; 11-15 min, 70% de B; 15-25 min, 10% de B. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi de 20 µL, e detecção UV a 254 e 360 nm.

Teste do micronúcleo *in vivo* (MN)

O teste do micronúcleo *in vivo* é largamente empregado em pesquisas de genética toxicológica, inclusive como teste padrão para avaliação e registros de novos produtos farmacêuticos. O mesmo permite avaliar os efeitos clastogênicos, que danificam o cromossomo, e os efeitos aneugênicos, que induzem a aneuploidia ou segregação cromossômica anormal. Por isso, o mesmo é utilizado na monitorização de alterações cromossômicas causadas por agentes químicos. O teste baseia-se na avaliação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados após exposição ao agente químico que se deseja investigar [58].

A obtenção e preparo das lâminas de eritrócitos de medula óssea para avaliação da frequência de micronúcleo (MN) seguiram a metodologia proposta por MacGregor et al.[59]. Para cada animal duas lâminas foram preparadas e codificadas em teste cego. Foram analisadas 2000 células por animal em microscópio de luz, com aumento de 1000 vezes (imersão). As lâminas foram decodificadas ao final das análises.

A porcentagem de redução na frequência de MN foi calculada de acordo com Water e colaboradores [60], através da equação:

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{frequência de MN em A} - \text{frequência de MN em B}}{\text{frequência de MN em A} - \text{frequência de MN em C}} \times 100$$

Nesta equação, A corresponde ao grupo tratado com CPA (controle positivo), B corresponde ao grupo tratado com *Hibiscus sabdariffa* mais CPA e C corresponde ao grupo tratado com NaCl 0,9% (controle negativo).

Delineamento Experimental

No 3º mês de vida, todos os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a classificação de obesidade e tratamento com o extrato aquoso de *H. sabdariffa*: **(1)** controle negativo (tratado com água e NaCl 0,9% intraperitoneal no 15º dia), **(2)** controle positivo (tratado com água e ciclofosfamida intraperitoneal (25 mg/kg p.c.) no 15º dia) e **(3)** (tratado com *H. sabdariffa* e ciclofosfamida intraperitoneal (25 mg/kg p.c.) no 15º dia) e **(4)** (tratado com *H. sabdariffa* e NaCl 0,9% intraperitoneal no 15º dia).

O tratamento ocorreu por via intragástrica (gavagem) por 15 dias, na dose de 400mg/kg/dia de peso corpóreo, adaptado de Peng et al [52]. Considerando o ganho de peso dos animais durante o tratamento, a dose foi ajustada periodicamente. A quantidade de ração oferecida para os grupos foi pesada todos os dias, tornando possível avaliar a média de consumo de ração por animal.

Após os 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia para obtenção da medula óssea para determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEs).

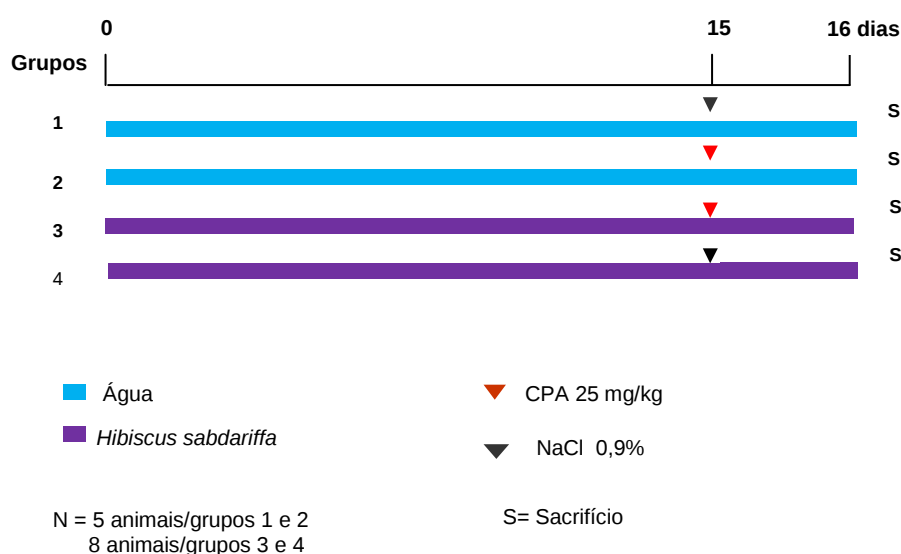


Figura 2: Protocolo experimental para avaliação do efeito antimutagênico e mutagênico do *Hibiscus sabdariffa* na frequência de micronúcleo, em células de medula óssea de ratos Wistar.

Análise Estatística

A frequência de células micronucleadas nos diferentes grupos experimentais foi avaliada pelo teste qui-quadrado [61]. A significância do teste foi de $P < 0,001$.

Agradecimentos

A Prof^a. Dr^a. Valéria Dornelles Gindri Senhorin e equipe e ao Prof. Dr. Gerardo Magela Vieira Júnior e equipe, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Químicas (Lipec/UFMT). À equipe do Laboratório de Fisiologia dos Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FISIOTOX/UFMT).

Bibliografia

¹Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual De Hortaliças Não-Convencionais. Brasília: MAPA/ACS, 2010:92.

²Morton JF. Roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. In: Fruits of Warm Climates. Miami: 1987.

³Prenesti R, Berto S, Daniele S, Toso S. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of hibiscus sabdariffa flowers. Food chemistry 2007;100: 433–438.

⁴Tsai PJ, McIntoshb J, Pearceb P, Camdenb B, Jordanc BP. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Research International 2002;35: 351–356.

⁵Rodriguez- MedinalC, Bentán-Débon R, Molina VC, Alonso-Villaverde C, Joven J, Menndez JA, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. Journal of Separation. Science. 2009;32:3441-3448.

⁶Mohd-Esa N, Hern FS, Ismail A, Yeel CL. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extracts and potential exploitation of the seeds. Food chemistry 2010;122:1055–1060.

⁷Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyaphrathatsara N, Sato H, Herunsale A, Suthisisang C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. Journal of Ethnopharmacology 2006;103:252–260.

⁸Lin TZ, Lin HH, Chen CC, Lin MC, Chou MC, Wang CJ. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. Nutrition Research 2007;27:140-145.

⁹Gurrola-Díaz DM, García-López PM, Sánchez-Enríquez S, Troyo-Sanromán R, Andrade-González L, Gómez-Leyva JF. Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract poder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine* 2010;17: 500–505.

¹⁰Alarcon-Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, Almanza-Perez JC, Romero-Núñez E, Campos-Sepulveda EA, Vazquez-Carrillo LI, Roman-Ramosal R. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in msg mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;114:66–71.

¹¹Faraji MH, Tarkhani AHH. The Effect of Sour Tea (*Hibiscus sabdariffa*) on Essential Hypertension. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;65:231–236.

¹²Ajay M, Chai HJ, Mustafa AM, Gilani AH, Mustafa MR. Mechanisms Of The Anti-Hypertensive Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Calyces. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;109:388–393.

¹³Ojeda D, Frerer FJ, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tortoriello J, Alvarez. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2010;127;7–10.

¹⁴Tseng TH, Hsu JD, Lo MH, Chu CY, Chou FP, Huang CL, Wang CJ. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 1997; 35:1159-1164.

¹⁵Alarcón-Alonso J, Zamilpa A, Alarcón Aguilar F, Herrera-Ruiz M, Tortoriello J, Jimenez-Ferrer E. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2012;139:751–756.

- ¹⁶Kuo CH, Kao ES, Chan KE, Lee HJ, Huang TF, Wang CJ. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of Function Foods*. 2012;4:375-381.
- ¹⁷Al-Mamun, Khatun MH, Nessa L, Islam MD, Munira S. In vitro evaluation of the antibacterial, cytotoxic and insecticidal activities of *Hibiscus sabdariffa* fruits. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 2011;3:144-149.
- ¹⁸Akindahunsi AA, Olaleye MT. Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2003;89:161-164.
- ¹⁹Patel S. *Hibiscus sabdariffa*: an ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2014;4 :23–27.
- ²⁰Olaleye MT. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2007;1:009-013.
- ²¹Mungoli A, Chaturvedi A. *Hibiscus sabdariffa* L. A rich source of secondary metabolites. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2011;6:01-18.
- ²²Cardoso CRP. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae) [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2006.
- ²³Brasil, Ministério da Saúde. Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?id=2>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

²⁴Lira WM. Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla*. [tese]. Araraquara: Faculdade De Ciências Farmacêuticas de Araquara, 2007.

²⁵Organização Mundial de Saúde. Global strategy on diet, physical activity and health: a framework to monitor and evaluate implementation [Internet]. Geneva: WHO; 2008

²⁶Muñoz M, Mazure RA, Culebras JM. Obesidad y sistema immune. *Nutrición Hospitalaria*, 2004, 19:319-324.

²⁷Lippman Sm, Hong WK. Cancer prevention science and practice. *Cancer Research* 2002;62:119-5125.

²⁸Bieski IGC, Santos FR, Oliveira RM, Espinosa MM, Macedo M, Albuquerque UP, Martins DTO. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;36.

²⁹Ruiz ALTG, Taffarello D, Souza VHS, Carvalho JE. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008;2:295-300.

³⁰Júnior, FVF. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do rio de janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso da população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008;18:308-313.

³¹Adetutu A, Odunola OA, Owoade OA, Adeleke OA, Amuda, OS. Anticlastogenic effects of hibiscus sabdariffa fruits against sodium arsenite-induced micronuclei formation in erythrocytes in mouse bone marrow. *Phytotherapy research* 2004;18:862–864.

³²Rosa RM, Moura DJ, Melecchi MIS, Santos SS, Richter MF, Camarão EB, Henriques JAP, Ramos ALLP, 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. *Toxicology in Vitro* 2007;21:1442–1452.

³³Hamid ZA, Lin WHL, Abdalla BJ, Yuen OB, Latif ES, Mohamed J, Rajab NF, Wah CP, Harto MPAW, Budin S. The Role of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle) in Maintenance of *Ex Vivo* Murine Bone Marrow-Derived Hematopoietic Stem Cells. *Scientific World Journal* 2014;2014:10.

³⁴Olvera-García V, Castaño-Tostado E, Rezendiz-Lopez RI, Reynoso-Camacho R, González de Mejía E, Elizondo G, Loarca-Piña G. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts inhibit the mutagenicity in microsuspension assay and the proliferation of HeLa cells. *Journal of Food Science* 2008;73:75-81.

³⁵Lin HH, Chen, Kuo WH, Wang CJ. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chemistry* 2012;132:880–891.

³⁶Adaramoye O, Ogungbenro B, Anyaegbu O, Fafunso M. Protective Effects of Extracts of *Verrononia amygdalina*, *Hibiscus sabdariffa* e Vitamina C Against Radiation-Induced Liver Damage In Rats. *Journal of Radiation Research* 2008;49.

³⁷Frank T, Netzel G, Kammerer DR, Carle R, Erwin AK, Bitsch KI, Bitsch R, Netzel M. Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. Aqueous Extract and its Impact on Systemic Antioxidante Potential in Healthy Subjects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012; 92: 2207–2218.

³⁸Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragon G, Rodríguez-Medina I, Rull A, Micol V, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutiérrez A, Camps J, Joven J. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* Calices Modulates The Production Of Monocyte Chemoattractant Protein-1 In Humans. *Phytomedicine* 2010;17:186–191.

³⁹Showande JS, Fakeye TO, Tolonen A, Hokkanen J. In vitro inhibitory activities of the extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (Family Malvaceae) on selected cytochrome

P450 isoforms. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 2013;10(3):533-540.

⁴⁰Sildi HÁ, Maeshall LJ, Morgan MRA. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry* 2014;164:23–29.

⁴¹Liu LC, Chen CC, Wang WH, Hsu JD, Yang MY, Wang CJ. The Protective Effects of *Hibiscus Sabdariffa* Extract on CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Rats. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44:336–343.

⁴²Liu LC, Wang CJ, Lee CC, Su SC, Chen HL, Hsu JD, Lee HJ. Aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. decelerates acetaminophen-induced acute liver damage by reducing cell death and oxidative stress in mouse experimental models. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010; 90: 329–337.

⁴³Ademiluyi A.; Oboh G, Agbebi JO, Akinyemi AJ. Anthocyanin – rich red dye of hibiscus sabdariffa calyx modulates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *International Journal of Biomedical Science* 2013; 9 (4): 243-248.

⁴⁴Chewonarin T, Kinouchi T, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Vinitketkumnuen U, Ohnishi Y. 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* 1999;37:591-601.

⁴⁵Takeda N, Yasui, Y. Identification of mutagenic substances in roselle color, elderberry color and safflower yellow. *Agriculture and Biological Chemistry* 1985;49:1851–1852.

⁴⁶Montero ACR, Arnáez GP, Esperón NF, Barro AM, Pérez MEA, Rodríguez AM. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología* 2001;18(2):75-78.

⁴⁷Dajori ALF, Manenti AV, Damazio DDC, Leffa DD, Andrade VM. Influência de extratos de *Hibiscus acetosella* Welw. Ex Hiern sobre a genotoxicidade e mutagenicidade induzida por agentes alquilantes em camundongos. 4ª Semana de Ciência & Tecnologia da UNESC 2013

⁴⁸Orisakwe OE, Husaini DC, Afonne OJ. Testicular Effects of Sub-Chronic Administration of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Aqueous Extract in Rats. Reproductive Toxicology 2004;18:295–298.

⁴⁹Kim JK, So H, Youn MJ, Kim HJ, Kim Y, Park C, Kim SJ, Ha YA, Chai KY, Kim SM, Kim KY, Park R. *Hibiscus sabdariffa* L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3K and MAPK pathway. Journal of Ethnopharmacol 2007;114(2):260–267.

⁵⁰Iyare EE, Adegoke OA, Nwagha IU. Mechanism of the decreased food consumption and weight gain in rats following consumption of aqueous extract of the calyx of *hibiscus sabdariffa* during pregnancy. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2010;185-188.

⁵¹Perez-Torre I, Ruiz-Ramirez A, Banos G, El-Hafidi M. *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Malvaceae), curcumin and resveratrol as alternative medicinal agents against metabolic syndrome. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2012;11(1):25-37.

⁵²Peng CH, Chyau CC, Chan KC, Chan TH, Wang CJ, Huang CN. *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011;59: 9901-9909.

⁵³Ferreira FG, Regasini LO, Oliveira AM, Campos JADB, Silva DHS, Cavalheiro AJ, Santos RA, Bassi CL, Bolzani VS, Soares CS. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações e *Pterogyne nitens* (Leguminosae)

utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. Revista Brasileira de Farmacognosia 2009;19:61-677.

⁵⁴Campos KE, Volpato GT, Calderon IMP, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of obesity on rat reproduction and on development of their adult offspring. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2008;41(2):122-125.

⁵⁵Delmanto RD, Lima PL, Sugui MM, da Eira AF, Salvadori DM, Speit G, Ribeiro LR. Antimutagenic effect of agaricus blazei murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. Mutation Research-Genetic Toxicology 2001;496:15-21.

⁵⁶Rang HP. Farmacologia. Rio de janeiro: Elsevier, 2007.

⁵⁷Mouco G, Bernardino MJ, Cornélio ML. Controle de qualidade de ervas medicinais. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 2013;31:68-73.

⁵⁸Ribeiro EB, Marmo MR, Andrade IS, Dolnikoff MS. Effect of fasting of monosodium glutamate-obese rats. Brazilian Journal of Medical and Biology Research 1989;22:919-921.

⁵⁹MacGregor JR, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone M, Tice R, Wild D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutation Research, 1987;189:103-12.

⁶⁰Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenic profiles for some model compounds. Mutation Research 1990;238:57-85.

⁶¹Pereira CAB. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-gay MN, Rodrigues MA, La R, Montelleone-Neto (eds.) Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. São Paulo: FCA, 1991.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nestes dois capítulos mostram que o tratamento de ratos com extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* modificou positivamente o metabolismo dos ratos. O estudo mostrou ainda que o *H. sabdariffa* L. contém compostos antimutagênicos, os quais indicam ter um potencial quimiopreventivo contra substâncias genotóxicas e, conseqüentemente a carcinogênese.

A presença de compostos antioxidantes, como os flavonoides, está relacionada aos efeitos fisiopatológicos encontrados, o que foi confirmado nos testes químicos.

As bases científicas para a afirmação de que as plantas medicinais e suas substâncias bioativas desempenham um papel importante na prevenção e no tratamento de doenças crônicas e degenerativas está avançando continuamente. Nesse sentido, muitos estudos consideram que o *Hibiscus sabdariffa* poderia inclusive fazer parte da dieta alimentar da população, que assim poderia prevenir determinadas doenças. Investigações como essa são válidas para fornecer recomendações sobre o uso potencial do *Hibiscus sabdariffa* para o benefício da saúde pública. Certamente, mais estudos são necessários para comprovar que o *Hibiscus sabdariffa* tem interesse farmacológico.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



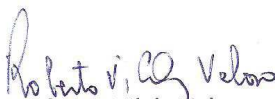
CERTIFICADO

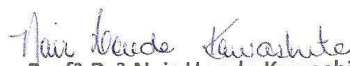
Certificamos que o Protocolo Nº 23108.705702/13-9, sobre “Estudo dos efeitos metabólicos e genotóxicos do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* L. em ratos obesos” sob a responsabilidade de **Prof. Dr. KLEBER EDUARDO DE CAMPOS/ANA CARLA GUIDINI VALENTINI GHELLER & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **13/03/2014**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.705702/13-9, entitled "Study of metabolic and genotoxic effects of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in obese rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Mar 13, 2014**.

Cuiabá-MT, 14 de março de 2014.


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Profª Drª Nair Honda Kawashita
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br

CAPÍTULO 1 – Instruções aos autores.

Instructions to authors Revista Brasileira de Farmacognosia BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY

The Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

GENERAL RULES

- All submitted manuscripts must not have been published. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not recommended. The journal will accept contributions on the understanding that the author has obtained the necessary authority for publication. In the case of multiple authors, each author must inform the corresponding author that he/she consents to submission of the article to The Revista Brasileira de Farmacognosia.
- The Revista Brasileira de Farmacognosia accepts for publication original scientific work, reviews and communication articles written only in English. The content of the text is entirely the responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor, Editorial Board or members of the Advisory Board.
- Manuscripts written by authors whose native language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Assistance of independent editing services can be found at <http://www.sbfgnosia.org.br/revista>. All services are paid for and arranged by the author, and the use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.
- The Revista Brasileira de Farmacognosia reserves the right to submit all received manuscripts to ad hoc referees, whose names will be kept confidential, and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may return manuscripts to the Editor-in-Chief or Section Editors for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations which are to be made to conform to the standards and editorial rules of the journal.
- All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong.
- All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material and the location of the voucher specimen.
- Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.
- Manuscripts dealing with essential oils that contain seasonal harvest and biological activity and which explore mechanisms of action or synergism are welcome.
- The journal will not accept responsibility for research works that do not comply with the legislation of the country of residence of the author.
- We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, *in-vitro* or *in vivo* tests using animals.
- The following immediate rejection criteria apply
 - i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the journal;
 - ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal (see Section 3);
 - iii. the manuscript results are preliminary;
 - iv. manuscripts reporting activity data without comparison with a reference, without a positive control/appropriate control or not based on adequate statistics;
 - v. the biological source (e.g. plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated and documented;
 - vi. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds;
 - vii. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ($\mu\text{g/ml}$) for antimicrobial activity ($>250 \mu\text{g/ml}$ for plant extracts and $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ for pure compounds) and without appropriate identification of culture collections/strain designation codes;
 - viii. experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without appropriate statistical analyses; without oil yield (%) and characterization and component quantification not undertaken using GC-MS-FID and analyses of the retention indices of the components not calculated using n-alkane homologous series together with analyses of some of the isolated natural components. Biological activity results without chemical characterization of the compounds
 - ix. too preliminary data using *in-vitro* assays will not be acceptable if (i) no information on the type of activity is given; (ii) single dose or very high concentrations (must show dose-response studies); (iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); (iv) lack of appropriate controls (solvents; positive or negative substances according to the study); (v) no IC_{50} values (if applicable).
 - x. manuscripts with repetition of a single bioassay for yet another extract or plant;

- xi. use of only the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to access the toxicity of extracts;
 - xii. isolation and bioassay of well-known compounds with small or no relationship to the activity, or to the medicinal use of the plant without clear justification;
 - xiii. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization.¹
- All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name

RULES FOR THE ELABORATION OF CONTRIBUTIONS

- The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript in the event of loss or damage to the original sent to the journal.
- Figures (photographs, charts, drawings etc.) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numerals. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations and located underneath the figures. If figures are from another font, formal authorization is required.
- Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Tables (numerical data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables should be placed.
- The captions of botanical illustrations (abbreviations of anatomical descriptions) should be in accordance with the rules adopted by the journal. Please request standards by email to revista@sbfgnosisia.org.br.

TEXT FORMATTING AND CONTENTS OF THE WORK

- **Original papers:**
Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Authorship, References, Figures with Legends, Tables and Structural Formulae. Results and Discussion sections may appear as a combined 'Results and Discussion' section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted in exceptional and well-justified cases. If submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement in the covering letter, giving compelling reasons for the length of the paper.
- **Brief communications:**
This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without

headlines, Acknowledgements, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words.

- Reviews will, in general, be invited by the Editor-in-Chief and only those with more than 100 references will be considered. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be concise and not include experimental details.
- In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample covering letter are available at www.sbfgnosisia.org.br/revista. Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.
- The originals should be on A4-sized paper, double-spaced using Times New Roman size-12 font, fully justified, with margins of 2 cm.
- **Title and subtitle:**
They should be in lower case, using Times New Roman size-14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the journal.
- **Authors:**
The authors' names should appear centred underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (e.g. Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.
- **Author affiliations:**
After each author name there should be superscript Arabic numerals indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address, telephone number and fax number of the main author should appear after the References. The journal will not publish commercial e-mail addresses.
- **Abstract:**
A brief and concise abstract of < 300 words highlighting the most important information (including the methodology, results and conclusions) that allows readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding reading of the entire work.
- **Keywords:**
Very important for database searches, thus validating the article. The authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.
- **Introduction:**
The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published and where they are available.
- **Materials and methods:**
The description of the Material and the Methods used should be brief and sufficiently clear for comprehension and reproducibility of the work. Processes and techniques

¹Standardization of the plant extracts is considered to be the complete description of manufacturing parameters such as granulometry, solvent-plant ratio, time of extraction, solvent composition etc., together with marker quantification or chromatographic fingerprint analyses.

already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://www.tropicos.org>, <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/> or <http://www.theplantlist.org/> or.

• Results:

The Results should be presented with minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by suitable tables and figures. The data, if pertinent, should be subjected to statistical analyses.

• Discussion:

The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based upon them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion can be presented as one section.

• Acknowledgements:

This is an optional item. Please acknowledge anyone who made a substantial contribution towards the article.

• Author contributions:

The role of each author involved in the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, and he/she should be referred to by his/her initials. Please see the template for examples available at www.shfgnologia.org.br/revista.

REFERENCES

The formatting of the references should be standardised to conform to the requirements of the journal as outlined. Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide. Endnote® users, please see the template section available at www.shfgnologia.org.br/revista to obtain the Endnote® style for RBFAR.

- References within the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis, e.g. (Silva, 1999) or (Silva and Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, e.g. (Silva, 1999, p. 24).
- The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:
 - Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html> or <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>). In the case of an authorised abbreviation of a certain periodical that cannot be located and is not obvious, the title should be cited complete (e.g.): Kumar, D., Shujbal, S.S., Deoda, R.S., Mudgale, S.C., 2010. In-vitro and in-vivo antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. *J. Sci. Res.* 2, 196-202.
- In case the cited journal is not readily accessible, the Chemical Abstract Number can be quoted, as follows: Qu, W., Li, J., Wang, M., 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22, 203-206, apud Chemical Abstracts 116, 124855r.
- In a citation, the sources should be shown in italics: Wax, E.T., 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J. Braz. Bot.* 41, 77-82, apud *Nat. Prod. Abs.* 23, 588-593, 1978.

• Book:

Costa, A.F., 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

• Book chapter:

El Sohly, M.A., Stanford, D.S., Murphy, T.P., 2007. Compounds properties and drug quality. In El Sohly, M.A. (org.) *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

• Thesis or dissertation materials:

Singab, A.N.B.I., 1996. Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants. Tokyo 173p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy.

Romero, M.A.V., 1997. Estudo químico de *Brayleya hirsuta* Benth e do mecanismo de ação da escopoletina. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

• Scientific meetings:

Oliveira, R.M.M.W., Lalli, L.F., Santos, C.A.M., 2006. Possible involvement of GABA_Abenzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. 19th ECNP Congress. Paris, France.

• Patents:

Should be identified as indicated below; whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be in-formed.

Ichikawa, M., Ogura, M., Lijima, T., 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatifida*, Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396, apud Chemical Abstracts 105, 178423q.

• Internet pages:

Taylor, L., 2000. Plant based drugs and medicines. <http://www.rainforest.com/plantdrugs.htm>, accessed Oct 2009.

ABBREVIATIONS

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are: m (meter); cm (centimeter); mm (millimeter); μ m (micrometer); nm (nanometer); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram); μ g (microgram); ng (nanogram); ml (milliliter); μ l (microliter); s (second); min (minute); h (hour); N (normal); M molar; mM (millimolar); μ M (micromolar); SD (standard deviation); SE (standard error); X (mean); Ci (Curie); mp (melting point); bp (boiling point); TLC (thin-layer chromatography); GC (gas chromatography); NMR (nuclear magnetic resonance); MS (mass spectrometry); UV (ultraviolet); CD (circular dichroism); IR (infrared); θ instead of rpm; ppm (parts per million); cpm (counts per minute); dpm (disintegrations per minute); Hz (Hertz); LD₅₀ (median lethal dose); LC₅₀ (median lethal concentration); TIV (threshold limit value). When using a word that is asserted to be a proprietary term or trademark, authors must use the symbol ®.

ILLUSTRATIONS

- The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the production staff of the journal. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.
- Remove all colour from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in colour (see Costs section for details).

- Chemical structures are not considered as figures; should be numbered sequentially in bold letters according to their citations in the manuscript, and placed closed to the desired point in the manuscript body. Structures should be drawn according to the style set by the American Chemical Society. Preferences for the drawing of structures can be found as a pre-set style in appropriate software packages.
- Upload each figure in .tiff, .jpg or .eps format. The figure number and the top of the figure should be indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that will be clearly legible upon reduction and which is consistent within each figure and set of figures. If a key to symbols is required, please include this in the figure legend.
- The journal uses recycled paper, so colour pictures are accepted and will be available only online unless the author(s) agree to cover the extra expenses for the print publication irrespective of the number of pages of the article.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

- Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.
- Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbfar-scielo>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by e-mail will not be accepted.
- Important: All authors, with their respective e-mail addresses, should be entered into the system.
- The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board.

PROCESSING FEE

- The journal charges nominal publication fee for articles upon acceptance to cover production cost.

- The charge is US\$ 200.00/paper when the corresponding author is a member of the Brazilian Society of Pharmacognosy and US\$ 300.00/paper for nonmembers. Articles with high scientific relevance will have reduced fee.
- A limited number of waivers for article processing charges are also available at the editors' discretion, and authors wishing to apply for these waivers should contact the editors.
- Editors and reviewers have no access to whether authors are able to pay; decisions to publish are only based on editorial criteria.

PROOFS AND REPRINTS

- Galley proofs will be sent to all authors as a PDF file. Rephrasing of sentences or additions is not permitted at the page-proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 5 days of receipt to ensure timely publication of the manuscript.
- The journal does not provide reprints to corresponding authors.
- Before publication, the articles will be available ahead of print on the Scielo Portal.

Please contact the editor if you have any questions.

Revista Brasileira de Farmacognosia
Professor Cid Aimbiré M. Santos, Editor
Laboratório de Farmacognosia,
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothário Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfn.org.br

September 2013.

CAPÍTULO 2 – Instruções aos autores.

Guidelines for Authors

1. Editorial Policy

PLANTA MEDICA – journal of Medicinal Plant and Natural Product Research is published in 18 issues a year. The following areas of medicinal plant and natural product research are covered:

1. Biological and pharmacological activity

2. Pharmacokinetic investigations and clinical studies (Pharmacokinetic investigations examining the kinetics of drug disposition and bioavailability including the use of *in vitro*, *in vivo* and human studies)

3. Natural product chemistry

4. Analytical studies

Only papers of highest scientific quality, concisely written and complying with these Guidelines for Authors can be considered for publication. All contributions are peer-reviewed by independent referees.

Submission of a manuscript to *Planta Medica* implies that it represents **original research not previously published and that it is not being considered for publication elsewhere**.

The corresponding author must declare that the manuscript is submitted on behalf of all authors. Copyright belongs to the publisher upon acceptance of the manuscript. There are no page charges.

The language of publication is **English**. Manuscripts written by authors whose mother tongue is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. **Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.**

Authors investigating the chemistry of a single species should aim to publish their results in a single manuscript rather than in a series of papers. Manuscripts should not report fragmentary parts of a larger study. **Pharmacological investigations of extracts require detailed extract characterisation (see below).**

Submission of a manuscript signifies acceptance of the journal's Guidelines for Authors. Submissions which are not in line with these principles may be returned directly to the authors by the Editorial Office.

A statement clarifying the **conflicts of interests** of all authors must be included at the end of the manuscript (before the references); this will be published. Conflicts of interest also need to be declared during the submission process. Declaration of conflicts of interest is mandatory; if none, this also needs to be stated.

2. Submission of Manuscripts

Manuscripts can be submitted exclusively online at <http://mc.manuscriptcentral.com/plamed> or using the link at <http://www.thieme.de/plantamedica>. Submissions of hardcopy manuscripts or by e-mail will not be accepted.

A sample manuscript (for Original Papers) is available at <http://mc.manuscriptcentral.com/plamed> → Instructions and Forms, and at www.thieme.de/plantamedica. In addition to the Guidelines, authors are urged to follow these formats when preparing a manuscript.

18 Basic Rules for a Publication in *Planta Medica*

Manuscripts will not be considered for publication in *Planta Medica* unless the following conditions, if applicable, are fulfilled:

1. **Ethical considerations:** Submission of a manuscript to *Planta Medica* implies that it represents **original research** not previously published and that it is **not being considered for publication elsewhere**. Authors investigating the chemistry of a single species should aim to publish their results in a single manuscript rather than in a series of papers. **Manuscripts should not report fragmentary parts of a larger study.**

2. Language of publication is **English**. Manuscripts written by authors whose mother tongue is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission.

3. **Plant material** (as well as other organisms) must be properly identified. The scientific name (in italics), the author of this name and the family must be given. It should be mentioned who identified the material. The manuscript must include references to **voucher specimens** of the plants (deposited in a major regional herbarium) or the material examined.

4. **Isolation of compounds:** Extraction and isolation should be described in detail. The kind and amount of material, solvents and extraction methods must be indicated. The description of chromatographic systems should contain the quantitative information that allows the reader to repeat the work. Column dimensions, elution volumes, fraction sizes, etc. should be reported.

5. **Analytical studies:** Key data on method validation must be provided and should typically include information on specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, intermediate precision, and some robustness studies. Information on the purity of reference compounds, and on the methods used for the determination of purity must be given. Recoveries of extraction and sample pre-purification steps have to be indicated. Adequate statistical treatment of data is required. Analytical studies of a routine nature will not be considered for publication.

6. **Pharmacological investigations of extracts require detailed extract characterisation.** Chromatographic profiling (e.g. HPLC profile with at least the major peaks identified) should be carried out, or qualitative and quantitative information on active or typical constituents should be provided.

7. **Pharmacological investigations:** *Planta Medica* will only consider manuscripts in which conclusions are based on adequate statistics. In each case **positive controls** (reference compounds) should be used and the dose/activity dependence should be shown.

8. **Pharmacological investigations:** When working with **experimental animals**, reference must be made to principles of laboratory animal care or similar regulations, and to approval by the local ethical committee. The approval number and the corresponding date must be provided.

9. **Clinical studies** must be designed, implemented and analyzed in a manner to meet current standards of randomised controlled trials. Reference must be made to approval of the study by the local ethical committee. The approval number and the corresponding date must be provided.

10. **Biological screening:** Papers dealing with the biological screening of a meaningful number of extracts of plants or other organisms can be considered for publication in *Planta Medica*. Identification of the material must be properly documented, and preparation of the extracts must be clearly described. Biological activities should be reported by listing IC_{50} values, or at least a dose-response relationship should be shown by using at least two test concentrations. Positive controls (reference compounds) must be included. Results should be presented in a concise format, and the discussion should be kept to a minimum.

Commonly used text processors should be used for preparation of the manuscripts. No pdf files must be submitted. The manuscript has to be accompanied by a **cover letter**, in which the authors briefly explain the significance of their findings and the interest to the readership of *Planta Medica*.

The **manuscript** (main text, tables, structural formulas and figures) should be submitted as **one file**. Figures will be automatically rendered in colour online and black and white in print. Colour reproduction in print will be subject to fees of EUR 440 for the first colour figure and EUR 80 for any further figure (incl. 19% VAT). Authors are strongly encouraged to provide non-essential but useful data, figures and tables as **Supporting Information** (see below).

3. Format of Manuscripts

3.1. Original Papers. Original papers are research articles describing original experimental results. The material should be arranged in the order: Title Page/Abstract/Keywords/Abbreviations/Introduction/Results and Discussion/Materials and Methods/Acknowledgements/Conflicts of Interest/References/Figure Legends/Tables/Structural Formulas/Figures. Results and Discussion sections may appear as two separate parts or as a combined "Results and Discussion" section. No subheadings are allowed within this section. The normal length of the **main text** of an Original Paper, **excluding** references, tables, figures and figure legends, is about **3,000 words**. In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement, giving compelling reasons for the length of the paper.

3.2. Rapid Communications are intended for the publication of exceptionally significant new and original results, such as unusual structures, bioactivities and innovative analytical techniques that deserve rapid publication, in the format of an Original Paper. If authors want their submission to be considered as a Rapid Communication, they should provide a justification statement for this with their manuscript. However, also regular submissions can be selected by the Editors for rapid communication after the review process.

3.3. Reviews will generally be **invited** by the Editor-in-Chief or the Review Editor. They should be as concise as possible and do not need to include experimental details. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in this area. Reviews should contain an abstract, and 4–6 keywords should be listed.

3.4. Minireviews and Perspectives will generally be **invited** by the Editor-in-Chief or the Review Editor. Minireviews provide concise and critical updates on a subject of high interest. Perspectives are written by leading experts in an emerging field and provide a concise assessment of the current state-of-the-art and an outlook on future developments. The normal length of the **main text** of Minireviews and Perspectives, **excluding** references, tables, figures and figure legends, is about **1,500 words**.

3.5. Editorials addressing topical issues of general interest to the readership of *Planta Medica* will be published on an irregular basis. They are written by the Editor-in-Chief, other Editors, or by experts on a specific issue in the form of an Invited Editorial.

4. Preparation of Manuscripts

Please note that papers published in *Planta Medica* now follow the IRDMAR structure: Introduction, Results and Discussion, Materials and Methods, Acknowledgements, References.

In addition to the Guidelines, authors should consult the **sample manuscript** (for Original Papers) at <http://mc.manuscriptcentral.com/plamed> → Instructions and Forms, or at www.thieme.de/tz/plantamedica prior to preparing their contribution. Commonly used text processors should be used for preparation of the manuscripts.

For submission of all manuscripts, follow the instructions of the online submission system. Before submission, prepare the cover letter, and keep ready all information on the manuscript (title, full name and affiliation of all authors, abstract, name of all files to be submitted). **The author submitting the manuscript will be corresponding author.**

4.1. The Title Page must contain the title of the manuscript, the full names referenced by numerical superscripts with affiliation and addresses of all authors, and the full address of the corresponding author.

4.2. The Abstract should contain brief information on purpose, methods, results and conclusion (without subheadings).

4.3. The Keywords should include the scientific name and family of the plant(s) or other organism(s) investigated. 4–6 keywords should be listed.

4.4. Abbreviations should generally be used sparingly. Standard abbreviations such as m.p., b.p., K, s, min, h, µL, mL, µg, mg, g, kg, nm, mm, cm, ppm, mmol, HPLC, TLC, GC, UV, CD, IR, MS, NMR can be used throughout the manuscript. Non-standard abbreviations must be defined in the text following their first use. Provide a list of all non-standard abbreviations after the keywords. Define all symbols used in equations and formulas. If symbols are used extensively, provide a list of all symbols together with the list of abbreviations.

4.5. The Introduction should state the purpose of the investigation and relate to current knowledge in the specific topic addressed.

4.6. Results should be presented in a concise manner. Tables and figures should be presented in a manner which maximises clarity and comprehension. The **Discussion** should provide an interpretation of the data and relate them to existing knowledge. Subtitles are only admitted in exceptional cases.

4.7. Materials and Methods. Specific details about test materials and test compounds, instrumentation and experimental protocols should be given here. This section should contain sufficient details so that others are able to reproduce the experiment(s). Purity (%) of all reference and standard compounds should be mentioned, as well as the method how it was determined. Previously reported methods should be referenced only. Suppliers for major equipment, cell lines, chemicals, biochemical reagents and major disposables should be indicated.

4.7.1. Documentation of plants and other organisms or starting materials. Use the correct scientific nomenclature. For plants, the Index Kewensis (electronic Plant Information Centre ePIC, Royal Botanic Gardens, Kew, UK: <http://www.kew.org/epic>), and/or the Inter-

national Code of Botanical Nomenclature (www.loghm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/tokyo-e/default.htm) should be followed. Give the scientific name (in italics), the author of this name and the family. Indicate who identified the material. The manuscript must include references to voucher specimens of the plants (deposited in a major regional herbarium) or the material examined including their registration number(s). It should be mentioned which plant parts have been used.

4.7.2. Description of the preparation of extracts and isolation of compounds. The kind and amount of starting material, solvents and extraction methods must be indicated. The description of chromatographic systems should contain the quantitative information that allows the reader to repeat the work. Column dimensions, stationary phase, particle size, mobile phase composition, flow rate, sample amount, and elution volumes (or retention times, k' values) of fractions should be given. E.g.: "MPLC on silica gel (40–63 μ m; 2 $\times$ 50 cm), MeOH/EtOAc 8:2, 3 mL/min; k' of 1: 60–70 mL, 2: 120–140 mL, 3: 145–175 mL; detection of eluates by TLC (SiO₂, MeOH/H₂O 9:1; Dragendorff reagent). Rf 1: 0.35, 2: 0.55, 3: 0.73." When using gradients the volumes of solvents should be presented; fractions should be defined by their elution volume. Similar information is necessary for HPLC, GLC, DCCC, MLCC and all other methods of purification. Figures of chromatograms will only be accepted if they are essential for understanding the methods or the results described. GC identifications of constituents of essential oils must be supported by retention indices on a polar and an apolar column. Identification by GC-MS is preferred.

4.7.3. Physico-chemical characterisation of compounds. Data provided for new compounds should enable an unambiguous identification of the substance and have to appear in the following order, if available: visual appearance, chromatographic mobility in TLC, GC, or HPLC, mp, UV-vis, specific optical rotation, CD, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, low resolution MS, high resolution MS, elemental analysis. Note that for specific optical rotation $[\alpha]_D^{25}$, the symbol c is defined as mass of substance (in g) in 100 mL of solution. For specific optical rotation no unit should be specified; the "degree" symbol "°" should not be used. In case of spectroscopic work on known substances refer, if possible, to published data; the manuscript should then contain the following indication: Copies of the original spectra are obtainable from the corresponding author. Such original spectra and/or spectral assignments can be provided as Supporting Information (see below), as well as structural formula outlining NMR spectral correlations, MS fragmentations, etc. IR, NMR, mass, and UV spectra should normally not be given in the manuscript as figures, but only if the listing of characteristic signals is not sufficient.

4.7.4. Chemical nomenclature used should be based on the systematic rules adopted by Chemical Abstracts and IUPAC. Trivial names should be avoided unless they are definitely advantageous over the corresponding systematic names. Trivial names are not accepted for close analogues and derivatives of known compounds. For reference drug substances the INN names should be used.

4.7.5. X-Ray crystallographic data must include a line drawing of the structure, a perspective drawing, and a discussion of bond lengths and angles. A supplement describing full details of the structure and methods and means of its determination in a form suitable for deposition must be submitted to the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44 (0) 1223 33 60 33 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk). Deposition of the

data has to be prior to submission of the manuscript, and appropriate reference has to be made in the Materials and Methods section, including the deposition number.

4.7.6. Analytical studies. Key data on method validation must be provided and should typically include information on specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, intermediate precision, and some robustness studies. Information on the purity of reference compounds, and on the methods used for the determination of purity must be given. Recoveries of extraction and sample pre-purification steps have to be indicated. Adequate statistical treatment of data is required. For more information regarding validation issues, prospective authors should also refer to ICH guidelines. Analytical studies of a routine nature will not be considered for publication.

4.7.7. Pharmacological investigations. *Planta Medica* will only consider manuscripts in which conclusions are based on adequate statistics that incorporate the appropriate tests of significance, account for the type of data distribution and are based on the number of experimental observations required for the application of the respective statistical method. In each case **positive controls** (reference compounds) should be used and the dose/activity dependence should be shown. When working with experimental animals, reference must be made to principles of laboratory animal care or similar regulations, and to approval by the local ethical committee. The approval number and the corresponding date must be provided.

Pharmacological investigations of extracts require **detailed extract characterisation**. This includes botanical characterisation of plant material, solvent(s), duration and temperature of extraction, plus other method(s) used for preparation(s). The drug to extract ratio (DER) must be given. Chromatographic profiling (e.g. HPLC profile with a reference compound recorded at different wavelengths) should be carried out, with at least the major peaks identified, or qualitative and quantitative information on active or typical constituents should be provided. Altogether the phytochemical standardisation of an extract and/or fraction(s) require state-of-the-art methods.

4.7.8. Clinical studies. Studies reporting on plant preparations tested in humans will be accepted for review and publication. Clinical studies must be designed, implemented and analyzed in a manner to meet current standards of randomised controlled trials. For guidelines see the following reviews: Begg C et al. *JAMA* 1996; 276: 637–639 and Altman DG. *BMJ* 1996; 313: 570–571. Reference must be made to approval of the study by the local ethical committee. The approval number and the corresponding date must be provided. All methods and variables used in a trial should be described; the data must be based on adequate statistics. Herbal medicinal products used must be characterised as described above for pharmacological investigations.

4.7.9. Biological screening. Papers dealing with the biological screening of a meaningful number of extracts of plants or other organisms can be considered for publication in *Planta Medica*. Identification of the material should properly be documented, and preparation of the extracts should clearly be described (see above, sections 4.6.1 and 4.6.2). Biological activities should be reported by listing IC_{50} values, or a dose-response relationship should be shown by using at least two test concentrations. Positive controls (reference compounds) should be included. Results should be presented in a concise format, and the discussion should be kept to a minimum.

4.8. Acknowledgements should list persons who made minor contributions to the investigation and organisations providing support.

4.9. References should be numbered in the order in which they are cited in the text, using arabic numbers between square brackets, e.g. [1]; for multiple references, e.g. [1–3] or [1, 2, 5]. The list of references should be arranged consecutively according to the numbers in the text. Use Index Medicus abbreviations for journal titles. Authors bear complete responsibility for the accuracy of the references. The following examples illustrate the format for references:

a) Journals

Trate A, Nahrstedt A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods and the determination of rosmarinic acid in *Helena helix*. *Phytochem Anal* 1996; 7: 204–208

Article in press without doi:

Lim EK, Ashford DM, Hsu B, Jackson RG, Bowles DJ. Arabidopsis glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotech Bioeng*, in press

Article in press with doi:

Lim EK, Bowles DJ. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J*, advance online publication 8 July 2004; doi: 10.1038/sj.emboj.7600295

b) Books

Citation to complete book:

Mobley DJ. The plant book. 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1997: 520–521

Citation to article within a book:

Lechtenberg M, Nahrstedt A. Cyanogenic glycosides. In: Ikan R, editor. Naturally occurring glycosides. Chichester: Wiley & Sons; 1999: 147–191

Lorberg A, Hall MN. TOR: the first ten years. In: Thomas G, Sabatini DM, Hall MN, editors. TOR – target of rapamycin. Heidelberg: Springer-Verlag; 2004: 1–18

Multi-volume books and encyclopedias:

Warren SA. Mental retardation and environment. In: International encyclopedia of psychiatry, psychology, psychoanalysis and neurology. Vol. 7. New York: Aesculapian Publishers; 1977: 202–207

Pharmacopoeia of China, Part 1. Beijing: People's Health Press; 1977: 531–534

c) PhD and Diploma Theses

Dettmers JM. Assessing the trophic cascade in reservoirs: the role of an introduced predator [dissertation]. Columbus: Ohio State University; 1995

d) Patents

Cookson AH. Particle trap for compressed gas insulated transmission system. US Patent 4554399; 1985

e) Conference Paper

Okada K, Kamiya Y, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M. Localization and expression of geranylgeranyldiphosphate synthases in *Arabidopsis thaliana*. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, Baltimore, MD; 1999

f) Electronic Sources

Agatep R, Kirkpatrick RD, Parchaluk DL, Woods RA, Gietz RD. Transformation of *S. cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier

DNA/polyethylene glycol protocol. Technical tips online. Available at <http://research.hmn.com/tto>. Accessed September 22, 2005.

If no author is given, the title is used as the first element of the citation.

If reference is made to papers submitted or in press, authors are requested to add a file of the manuscript or galley proof to the online submission. Avoid references to unpublished personal communications.

4.10. Structural formulas should be prepared with ChemDraw® or a similar program using the following settings: bond lengths 0.508 cm, bond width 0.021 cm, bold bond width 0.071 cm, bond spacing 18% of length, hash spacing 0.088 cm, atom labels Helvetica 10, compound numbers Helvetica 10 bold. These settings correspond to American Chemical Society document settings preset in ChemDraw®. The configuration of all stereocenters present should be indicated; use of bold and dashed lines rather than solid and dashed wedges is recommended. The formulas should be integrated into the manuscript file (see above: 2. Submission of Manuscripts). They will be reproduced without reduction and the charts should be prepared with maximum widths of up to 8.0 cm for single column print and up to 17 cm for double column print.

4.11. Supporting information: To keep articles as concise and at the same time as informative as possible, authors are strongly encouraged to submit part of their tables and figures as Supporting Information. The following type of data will be preferentially published as Supporting Information rather than in the print article: High-resolution ball-and-stick and colour illustrations, spectra, chromatograms, structural drawings outlining NMR correlations, experimental procedures of secondary importance, tables summarising data that are non-essential but useful to the understanding of an article. Tables, figures and text provided as Supporting Information must be referred to in the manuscript as follows: (Table 1S, Supporting Information, etc.).

The cover page for Supporting Information must contain the title of the manuscript, names and affiliations of all authors, and the full address of the corresponding author. Legends for Figures and Tables must appear directly on the respective figure pages. Pages have to be numbered consecutively. **Supporting Information has to be submitted as a separate file.**

Supporting Information is published on the journals homepage at <http://www.thieme-connect.de/journals/toc/plantamedica>.

5. Proofs and Reprints

Galley proofs will be sent to the corresponding author as a PDF file. An electronic author reprint will be supplied free of charge after online publication.

January, 2013

© 2013 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York.

All rights reserved.

For further information, please contact plantamedica@thieme.de