

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fernanda Ziegler Reginato

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS  
DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. E DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA  
SOBRE ESSE EXTRATO**

Santa Maria, RS  
2017

**Fernanda Ziegler Reginato**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. E DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE ESSE EXTRATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliane de Freitas Bauermann  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilberti Helena Hübscher Lopes

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reginato, Fernanda Ziegler

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. E DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE ESSE EXTRATO / Fernanda Ziegler Reginato.- 2017.

63 p.; 30 cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann

Coorientadora: Gilberti Helena Hübscher Lopes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. *Hibiscus rosa-sinensis* 2. Toxicidade oral 3. Plantas medicinais 4. Radiação gama I. Bauermann, Liliâne de Freitas II. Lopes, Gilberti Helena Hübscher III. Título.

**Fernanda Ziegler Reginato**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. E DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE ESSE EXTRATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 18 de agosto de 2017:**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Gilberti Helena Hübscher Lopes, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Coorientadora)

---

**Patricia Severo do Nascimento, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Cristiani Folharini Bortolatto, Dr.<sup>a</sup> (UFPel)**

Santa Maria, RS  
2017

*Com amor, dedico este trabalho aos meus pais, Francisco e Nara Beatriz, aos meus irmãos, Giovane e Franciele, e aos meus sobrinhos, Alexandre e Mateus.*

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ser a minha luz e por me fortalecer, ajudar, sustentar e capacitar, tornando possível a realização de mais esse sonho.

Ao meu pai, meu exemplo de dedicação, determinação e honestidade. Obrigada por sempre ter me incentivado a estudar e me dado todas as condições para isso, e por ter me ensinado os valores que me fazem ser a pessoa e profissional que sou hoje. É uma honra ser sua filha.

A minha mãe, sinônimo de amor, carinho e ternura, pela sua força, por ser guerreira, batalhar, nunca desistir e nem se abater. Obrigada por ter me educado sempre com um sorriso nos lábios e muito amor no coração, por ter ficado ao meu lado durante toda essa caminhada, por nunca ter soltado a minha mão, por apoiar os meus sonhos e participar da realização de todos eles. Sem a senhora eu jamais teria conseguido chegar aqui.

Ao meu irmão e amigo, por estar sempre presente com os seus conselhos e com a sua amizade, por me guiar e ajudar a tomar as melhores decisões. Obrigada por ter sido sempre um exemplo pra mim, pela excelente pessoa, pai e profissional que és, pelo teu apoio e incentivo nos estudos e por me mostrar o caminho a seguir.

A minha irmã e amiga, por estar sempre ao meu lado, pela amizade, companheirismo, união, por acreditar em mim, me escutar, ajudar, apoiar e incentivar. Você é um dos pilares que me sustenta e a luz que ilumina e torna a minha vida muito mais clara, alegre e linda.

A minha orientadora, professora Liliane, por todos os ensinamentos, experiência e conhecimento. Gratidão à senhora por ter sido sempre compreensiva comigo, por me estimular a crescer, por ter me ajudado desde quando dei os primeiros passos na graduação e pelo estímulo para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada por ser uma pessoa maravilhosa, por ter um coração enorme, por ser muito mais que uma orientadora, e sim uma mãe para cada um dos seus alunos. Obrigada por sua presença ir muito além do ambiente acadêmico e profissional.

A minha coorientadora, professora Gilberti, pelas suas contribuições, por ser uma referência como profissional e pelo estímulo para realização do trabalho.

Aos amigos do LaFEx, obrigada pelo auxílio na realização dos experimentos, pela troca de conhecimentos e pelos ótimos momentos vividos. Em especial, agradeço às amigas que estiveram comigo durante todo o mestrado, Camille, Kássia, Pati, Roberta, Ju, Rachel e Dida. Obrigada por toda ajuda, não só no trabalho, mas também fora dele, pela parceria,

companheirismo, histórias, risadas, mates e esportes radicais. Com certeza levo vocês no meu coração para o resto da vida.

A Camille, embora não tenha palavras suficientes para expressar a minha gratidão, quero deixar registrado o meu muito obrigada pela paciência em me ouvir e em me ajudar a esclarecer todas as dúvidas (que não foram poucas), por ter realizado todos os experimentos comigo, me ajudado na escrita e revisão do trabalho e ainda com a tradução. Agradeço pela amizade sincera e fiel, por eu poder contar independente da situação, pelos conselhos em todas as áreas, e por, apesar da distância, continuar a “brow” de sempre.

A Kássia, pela amizade e apoio em todos os momentos e mesmo à distância. Obrigada pelos mates e longas conversas, pela troca de aprendizado, incentivo nos estudos e por tornar mais alegre essa caminhada.

A Ju e a Rachel, pela ajuda no preparo do extrato, por terem me acolhido tão bem no Labinfito e pela parceria nos experimentos. Ganhei duas grandes amigas durante a realização desse trabalho.

A Roberta, pela ajuda nos experimentos com a planta, e por todas as conversas e risadas de sempre.

Ao setor de radioterapia do HUSM, pela irradiação do extrato, principalmente ao Tadeu, pela paciência e disposição em me ajudar.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, tanto profissional como pessoal.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de ensino, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida ao longo desses dois anos e que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho.

*O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.*

Provérbios 16:9.



## RESUMO

### **AValiação DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. E DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE ESSE EXTRATO**

AUTORA: Fernanda Ziegler Reginato  
ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann  
COORDINADORA: Gilberti Helena Hübscher Lopes

*Hibiscus rosa-sinensis* Linn., planta pertencente à família Malvaceae e popularmente conhecida como hibisco, mimo-de-vênus e hibisco-da-china, é utilizada na medicina tradicional como promotora do crescimento de cabelo, para melhorar a digestão, estimular o fluxo menstrual, bem como no tratamento da dor, fadiga e doenças de pele. Ademais, alguns estudos atribuem-lhe propriedades anti-inflamatória, antidiabética, anti-helmíntica e antitumoral. Da mesma forma que o hibisco, muitas outras plantas são empregadas como terapêuticas, porém, para isso é imprescindível que não apresentem toxicidade nem contaminantes. A radiação ionizante é uma promissora opção para a descontaminação e conservação de plantas. Tendo em vista a grande utilização das folhas de *H. rosa-sinensis* para o combate de patologias, o objetivo desse trabalho foi avaliar a segurança associada ao seu uso, determinando a toxicidade oral aguda e subaguda do extrato bruto das folhas de *H. rosa-sinensis* (CELH), além de quantificar os metabólitos secundários e a atividade antioxidante desse extrato. Outro objetivo foi verificar o efeito que a radiação ionizante desempenha nos níveis de constituintes, atividade e toxicidade dessa planta. Para isso, parte do CELH foi irradiado com radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  na dose de 1 kGy. O extrato bruto não irradiado (CELH-NIr) e o irradiado (CELH-Ir) foram submetidos aos mesmos testes: dosagem de polifenóis totais e flavonoides, identificação e quantificação de constituintes por meio de CLAE-UV, determinação da atividade antioxidante *in vitro*, e avaliação da toxicidade aguda e subaguda do extrato, como preconizado pelos Guias 423 e 407 da OECD, respectivamente. No estudo agudo, CELH-NIr e CELH-Ir foram administrados oralmente em uma única dose (2000 mg/kg) a ratos *Wistar* fêmeas, seguindo-se de minuciosa observação diária dos animais acerca de mudanças comportamentais, sinais de toxicidade e mortalidade, por 14 dias. Já na avaliação subaguda, ambos os extratos foram administrados oralmente em três doses (100, 200 e 400 mg/kg) durante 28 dias a diferentes grupos de ratos *Wistar* machos e fêmeas. Durante os dois estudos, os animais tiveram seu peso corporal monitorado, e ao final deles, parâmetros bioquímicos e hematológicos foram avaliados. O CELH apresentou expressiva atividade antioxidante, a qual foi potencializada pela radiação gama. Esta causou redução na concentração de flavonoides e polifenóis totais presentes na folha de *H. rosa-sinensis*. Através da CLAE-UV, identificou-se o composto ácido maslínico, que também teve sua concentração diminuída no CELH-Ir. Não foram observadas alterações comportamentais ou quaisquer sinais de toxicidade nos animais tratados com CELH. Valores de peso corporal, peso relativo dos órgãos e parâmetros hematológicos não foram alterados com o tratamento. Importantes marcadores de função hepática e renal também não apresentaram variação, indicando que tanto CELH-NIr como CELH-Ir não são hepato ou nefrotóxicos. Pequenas variações observadas em outros parâmetros bioquímicos não seguem padrão dose-resposta nem ocorrem igualmente nos dois sexos, ainda assim sugere-se que mais estudos sejam realizados para avaliar o efeito do hibisco por maiores períodos e esclarecer se as alterações estão relacionadas à planta. A radiação gama não interferiu na ausência de toxicidade apresentada pelo hibisco e pode ser útil para potencializar propriedades terapêuticas da planta.

**Palavras-chave:** *Hibiscus rosa-sinensis*. Toxicidade oral. Plantas medicinais. Radiação gama.

## ABSTRACT

### ASSESSMENT OF THE TOXICITY OF THE CRUDE EXTRACT OF *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. LEAVES AND THE EFFECT OF GAMMA RADIATION ON THIS EXTRACT

AUTHOR: Fernanda Ziegler Reginato  
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann  
CO-ADVISOR: Gilberti Helena Hübscher Lopes

*Hibiscus rosa-sinensis* Linn., plant belonging to the family Malvaceae and popularly known as hibiscus, “mimo-de-vênus” and “hibisco-da-china”, is used in traditional medicine as hair growth promoters, to improve digestion, to stimulate menstrual flow, as well as in the treatment of pain, fatigue and skin diseases. In addition, some studies attribute to it anti-inflammatory, antidiabetic, anthelmintic, and antitumor properties. Similarly to hibiscus, many other plants are used as therapeutic, however, for this it is indispensable that they do not present toxicity or contaminants. Ionizing radiation is a promising option for the decontamination and conservation of plants. Considering the widespread use of the leaves of *H. rosa-sinensis* to combat pathologies, the aim of this work was to evaluate the safety associated to its use, determining the acute and subacute oral toxicity of the crude extract of the leaves of *H. rosa-sinensis* (CELH), besides quantifying the secondary metabolites and the antioxidant activity of this extract. Another aim was to verify the effect that ionizing radiation plays in the levels of constituents, activity and toxicity of this plant. For this, part of the CELH was irradiated with gamma radiation of  $^{60}\text{Co}$  at a dose of 1 kGy. Crude extract non-irradiated (CELH-NIr) and irradiated (CELH-Ir) were submitted to the same tests: Total polyphenols and flavonoids dosage, identification and quantification of constituents by HPLC-UV, determination of the antioxidant activity *in vitro*, and evaluation of the acute and subacute toxicity of extract, as recommended by OECD guidelines 423 and 407, respectively. In the acute study, CELH-NIr and CELH-Ir were administered orally in a single dose (2000 mg/kg) to female *Wistar* rats, followed by minute daily observation of the animals on behavioral changes, signs of toxicity and mortality, for 14 days. At the subacute evaluation, both extracts were administered orally in three doses (100, 200 and 400 mg/kg) for 28 days in different groups of male and female *Wistar* rats. During the two studies, the animals had their body weight monitored, and at the end of the study, biochemical and hematological parameters were evaluated. The CELH presented expressive antioxidant activity, which was potentiated by gamma radiation. This caused a reduction in the concentration of flavonoids and total polyphenols present in the leaves of *H. rosa-sinensis*. Through the analysis by HPLC-UV, the compound maslinic acid was identified, which also had its concentration decreased in the CELH-Ir. No behavioral changes or any signs of toxicity were observed in animals treated with CELH. Values of body weight, relative organs weight and hematological parameters were not altered with the treatment. Significant markers of hepatic and renal function also showed no variation, indicating that both CELH-NIr and CELH-Ir are not hepato or nephrotoxic. Slight variations observed in the other biochemical parameters do not follow a dose-response pattern nor do they occur in both sexes, however, it is suggested that further studies are conducted to evaluate the effect of the hibiscus for longer periods and to clarify if the changes are related to the plant. Gamma radiation did not interfere in the absence of toxicity presented by the hibiscus and may be useful to potentiate therapeutic properties of the plant.

**Keywords:** *Hibiscus rosa-sinensis*. Oral toxicity. Medicinal plants. Gamma radiation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

- Figura 1- Flor de *Hibiscus rosa-sinensis* L. Fonte: autora.....18
- Figura 2- A. Extrato bruto das folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* acondicionado em tubos de vidro. B. Irradiador Theratron 780C. Fonte: Autora; NAJAFI *et al.*, 2017.....24

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Table 1- Total polyphenols (PT) content and total flavonoids (FT) in CELH. 50% Inhibitory Concentration (IC <sub>50</sub> ) determined by DPPH method.....	36
Table 2- Effect of single dose oral of CELH on body weight of females rats .....	37
Table 3- Biochemical parameters of females rats treated orally with CELH at single dose of 2000 mg/kg .....	37
Table 4- Hematological parameters of females rats treated orally with CELH at single dose of 2000 mg/kg .....	38
Table 5- Effect of repeated doses (28-day) of CELH on body weight of rats.....	40
Table 6- Relative organ weight (g/100 g of body weight) of rats treated orally during 28 days with CELH irradiated and non-irradiated .....	41
Table 7- Biochemical parameters of rats submitted to a 28-day oral treatment with CELH non-irradiated and irradiated .....	41
Table 8- Hematological parameters of rats submitted to a 28-day oral treatment with CELH non-irradiated and irradiated .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroide
δ-ALA	Ácido delta-aminolevulínico, do inglês <i>delta-aminolevulinic acid</i>
δ-ALA-D	Delta-aminolevulinato desidratase, do inglês <i>delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>
ALP	Fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
ALT	Alanina aminotransferase, do inglês <i>alanine aminotransferase</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase, do inglês <i>aspartate aminotransferase</i>
BHA	Hidroxianisol butilado, do inglês <i>buthylated hydroxyanisole</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado, do inglês <i>butylated hydroxytoluene</i>
BUN	Níveis de ureia, do inglês <i>blood urea nitrogen levels</i>
CELH	Extrato bruto das folhas de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn., do inglês <i>crude extract of leaves of hibiscus</i>
CELH-Ir	Extrato bruto das folhas de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. irradiado, do inglês <i>crude extract of leaves of Hibiscus rosa-sinensis Linn. irradiated</i>
CELH-NIr	Extrato bruto das folhas de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. não irradiado, do inglês <i>crude extract of leaves of Hibiscus rosa-sinensis Linn. non-irradiated</i>
CHOL	Colesterol total, do inglês <i>total cholesterol</i>
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
<sup>60</sup> Co	Cobalto 60
CRE	Creatinina, do inglês <i>creatinine</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GAE	Equivalente de ácido gálico, do inglês <i>gallic acid equivalent</i>
GLU	Glicose, do inglês <i>glucose</i>
Gy	Gray
HCT	Hematócrito, do inglês <i>hematocrit</i>
HGB	Hemoglobina, do inglês <i>hemoglobin</i>
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta, do inglês <i>high performance liquid chromatography with ultraviolet detection</i>
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%, do inglês <i>50% inhibitory concentration</i>
IFN-γ	Interferon-gama
i.p.	Intraperitoneal
kGy	Quilogray
LD <sub>50</sub>	Dose letal média, do inglês <i>median lethal dose</i>
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>
MCV	Volume corpuscular médio, do inglês <i>mean corpuscular volume</i>
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento, do inglês <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PLT	Plaquetas, do inglês <i>platelets</i>
PP	Proteínas plasmáticas, do inglês <i>plasma proteins</i>
RBC	Eritrócitos (glóbulos vermelhos), do inglês <i>red blood cells</i>
RE	Equivalente de rutina, do inglês <i>rutin equivalent</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>

S.D.	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>
SMDB	Santa Maria Departamento de Biologia
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa, do inglês <i>tumor necrosis fator-alpha</i>
TP	Proteínas totais, do inglês <i>total proteins</i>
TRIG	Triglicerídeos, do inglês <i>triglycerides</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultravioleta
WBC	Leucócitos totais (glóbulos brancos), do inglês <i>total leukocytes (white blood cells)</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS .....	16
1.1.1	<b>Família Malvaceae e espécie <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn.</b> .....	17
1.1.2	<b>Metabólitos secundários de plantas</b> .....	19
1.2	TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS.....	20
1.2.1	<b>Toxicidade oral aguda e de dose repetida</b> .....	21
1.3	IRRADIAÇÃO .....	22
1.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	25
1.5	OBJETIVOS .....	26
1.5.1	<b>Objetivo geral</b> .....	26
1.5.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	26
<b>2</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	27
2.1	SAFETY EVALUATION (ACUTE AND SUBACUTE STUDIES) OF NON-IRRADIATED AND IRRADIATED CRUDE EXTRACT OF <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. LEAVES IN WISTAR RATS.....	27
	<b>Abstract</b> .....	28
<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	29
<b>2</b>	<b>Materials and methods</b> .....	30
2.1	<i>Plant material and obtention of extract</i> .....	30
2.2	<i>Irradiation of crude extract</i> .....	31
2.3	<i>Chemical and reagents</i> .....	31
2.4	<i>Determination of total polyphenols content</i> .....	31
2.5	<i>Determination of total flavonoids content</i> .....	31
2.6	<i>Radical-Scavenging Activity – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay</i> .....	32
2.7	<i>Analysis of apolar compounds by HPLC-UV</i> .....	32
2.8	<i>Animals</i> .....	33
2.9	<i>Acute oral toxicity</i> .....	33
2.10	<i>Sub-acute oral toxicity</i> .....	34
2.10.1	<i>Organ weights</i> .....	34
2.10.2	<i>Delta-aminolevulinatase activity (<math>\delta</math>-ALA-D)</i> .....	34
2.11	<i>Blood analysis</i> .....	35
2.12	<i>Statistical analysis</i> .....	35
<b>3</b>	<b>Results</b> .....	35
3.1	<i>DPPH assay, total polyphenols and flavonoids content</i> .....	35
3.2	<i>Analysis of apolar compounds by HPLC-UV</i> .....	36
3.3	<i>Acute oral toxicity</i> .....	36
3.4	<i>Sub-acute oral toxicity</i> .....	38
<b>4</b>	<b>Discussion</b> .....	45
<b>5</b>	<b>Conclusion</b> .....	48
	<b>References</b> .....	49
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	53
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
	<b>ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA</b> .....	59
	<b>ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM</b> .....	60
	<b>ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY</b> .....	61

<b>ANEXO D – CROMATOGRAMA (CLAE-UV) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. NÃO IRRADIADO .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO E – CROMATOGRAMA (CLAE-UV) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. IRRADIADO .....</b>	<b>63</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

O Brasil é o país com uma das maiores riquezas biológicas do planeta, sendo conhecido pela sua ampla biodiversidade, a qual associada a grande diversidade social, com diferentes culturas, práticas e conhecimentos, resulta em um valioso saber acerca dos produtos naturais e suas aplicações terapêuticas (BRASIL, 2016). Desde os primórdios da humanidade até os dias atuais, a natureza significa uma importante provedora de agentes terapêuticos, sendo que os compostos naturais originaram mais de 50% dos medicamentos que são utilizados hoje e continuam sendo essenciais para as companhias farmacêuticas na busca por novos fármacos (RUBAN & GAJALAKSHMI, 2012). Esses medicamentos são sinônimos de inovação no mercado e têm atraído a atenção de empresas, tornando-se competitivos frente aos remédios alopáticos e dessa forma alcançaram significativa porcentagem do faturamento da indústria farmacêutica, com as vendas crescendo a cada ano (BRASIL, 2016). Até mesmo nos países desenvolvidos a aceitação dos remédios naturais é grande, principalmente como complementar a medicina tradicional (AMENYA *et al.*, 2014).

A fitoterapia é um método de tratamento caracterizado pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. As diferentes preparações de plantas medicinais, citadas anteriormente, constituem a planta medicinal em seu estado fresco, a droga vegetal, o derivado de droga vegetal e o fitoterápico. Planta medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos, sendo que planta fresca é aquela coletada no momento do uso. Quando a planta passa por processos de coleta, estabilização e/ou secagem ela passa a ser denominada droga vegetal. O derivado de droga vegetal é o produto de extração da droga vegetal, ou seja, extrato, tintura, óleo, cera e outros. Já o medicamento fitoterápico é o produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2016).

Em 2006 o Ministério da Saúde publicou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (Decreto nº 5.813/2006), objetivando assegurar à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicas, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. No ano de 2013 essa política beneficiou cerca de seis mil pessoas, que tiveram, através do Sistema Único de Saúde (SUS), um tratamento de saúde a base de plantas medicinais e fitoterápicas, e em

três anos o número de beneficiados aumentou 161%. Foram quase 16 mil pessoas que buscaram as farmácias de atenção básica para receber os insumos naturais no ano de 2015. O SUS oferta doze medicamentos fitoterápicos, sendo o guaco (*Mikania glomerata*), a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) e a isoflavona-de-soja (*Glycine Max*) os mais utilizados na rede pública brasileira (BRASIL, 2006; PORTAL BRASIL, 2016).

Dessa forma, observa-se a importância das plantas medicinais para a saúde da população e o grande potencial que esses produtos apresentam, podendo vir a originar muitos novos fármacos, mas para isso elevada gama de estudos com relação à eficácia, dose e segurança são necessários.

### **1.1.1 Família Malvaceae e espécie *Hibiscus rosa-sinensis* Linn.**

A família Malvaceae é composta por ervas, subarbustos, arbustos, lianas e árvores de pequeno e grande porte, possuindo em torno de 250 gêneros e 4.200 espécies, dos quais 80 gêneros e 400 espécies são encontrados no Brasil (SOUZA & LORENZI, 2005; VADIVEL *et al.*, 2016). As plantas pertencentes a essa família são muito variadas e algumas delas têm considerável valor econômico, tal como o *Gossypium barbadense* (algodão), que é a principal fibra cultivada, além de representar a segunda maior cultura de oleaginosa (GAD *et al.*, 2013) e o *Theobroma cacao* (cacau) e *Abelmoschus esculentus* (quiabo), notáveis cultivos agrícolas (RAHMAN & GONDHA, 2014).

Outra característica da família Malvaceae é o grande número de espécies que são plantas ornamentais em jardins. *Hibiscus syriacus*, *Hibiscus rosa-sinensis* e *Alcea rosea* são importantes exemplos (VADIVEL *et al.*, 2016). Ademais, diversas plantas dessa família são consideradas medicinais, sendo o *Hibiscus* um gênero bastante utilizado no tratamento de patologias. *Hibiscus mutabilis* Linn. é conhecido por aliviar sintomas e queixas pulmonares, além de suas flores serem estimulantes (RAHMAN & GONDHA, 2014). As sementes de *Hibiscus sabdariffa* Linn. são empregadas para reduzir hiperlipidemia e hipercolesterolemia, representando uma rica fonte de fibras (NYAM *et al.*, 2014; ALI & EL-ANANY, 2017). Já para o *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. são relacionadas propriedades terapêuticas a várias estruturas da planta, como flores, folhas e raiz (PEKAMWAR *et al.*, 2013). Entre os usos tradicionais das folhas estão promover o crescimento de cabelo, melhorar a digestão e como antidiarreico, promover a drenagem de abscessos, estimular o fluxo menstrual, bem como no tratamento da dor, fadiga e doenças de pele (JADHAV *et al.*, 2009; KUMAR & SINGH, 2012)

*H. rosa-sinensis* Linn., um dos principais representantes do gênero *Hibiscus* e da família Malvaceae, é um arbusto florido largamente disseminado nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (NATH & YADAV, 2016), sendo conhecido popularmente como hibisco, mimo-de-vênus, hibisco-da-china e na região amazônica é também chamado de pampola, aurora, firmeza-dos-homens, amor-de-homens e pampulha (figura 1). É uma planta híbrida, resultante do cruzamento de várias espécies, e pode medir até 3 metros de altura (SILVA *et al.*, 2016). As flores do hibisco têm variadas cores, porém as mais utilizadas como medicinais são as variações de flores vermelhas (JADHAV *et al.*, 2009). As folhas do hibisco têm forma ovada simples ou ovada-lanceolada, tendo a base inteira e o ápice grosseiramente dentado (KUMAR & SINGH, 2012).

Figura 1 – Flor de *Hibiscus rosa-sinensis* Linn.



Fonte: Autora.

Alguns estudos avaliaram propriedades terapêuticas do hibisco. Kandhare e colaboradores (2012) constataram que o extrato hidroalcolico das folhas de *H. rosa-sinensis* tem potente valor terapêutico na colite experimental induzida com ácido acético em ratos *Wistar*, através da atividade antioxidante e da inibição de mediadores pró-inflamatórios como óxido nítrico e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Já Arullappan e colaboradores (2013) avaliaram a atividade citotóxica do extrato das folhas de hibisco contra linhagem de células de

câncer leucêmico K-562, constatando que o extrato metanólico das folhas exibiu uma atividade citotóxica significativa contra a linhagem de células leucêmicas.

Aziz e colaboradores (2015), por sua vez, verificaram que o extrato etanólico das folhas de *H. rosa-sinensis* possui significativo efeito anticatarata em um modelo *in vitro* de catarata induzida por glicose em lentes de cabra, sendo que essa atividade pode ser atribuída à propriedade antioxidante apresentada pelo extrato. Além disso, Nath e Yadav (2016) constataram que o extrato das folhas do hibisco é um importante recurso para o controle de infecções intestinais helmínticas, ao verificar o efeito anticestoda desse extrato contra o helminto cestódeo *Hymenolepis diminuta*, conhecido como “tênia do rato”.

No estudo desenvolvido por Sahu (2016), que objetivou avaliar o possível efeito hepatoprotetor do extrato alcoólico das folhas de *H. rosa-sinensis* contra danos ao fígado causados por piroxicam em camundongos, verificou-se que, enquanto utilizado sozinho, o piroxicam ocasionou um relevante incremento na atividade das enzimas marcadoras de lesão hepática no soro dos animais. Porém, quando ao tratamento com esse AINE (anti-inflamatório não esteroidal) foi associado o extrato das folhas do hibisco, a atividade dessas enzimas tornou-se bastante semelhante a dos animais controle, indicando a proteção hepática desempenhada pelo extrato contra a toxicidade induzida pelo piroxicam.

Baseado no grande número de propriedades medicinais atribuídas ao *H. rosa-sinensis* e tendo em vista sua ampla utilização, salienta-se a importância de conhecer possíveis riscos associados ao seu uso.

### **1.1.2 Metabólitos secundários de plantas**

Os vegetais sintetizam compostos de diferentes maneiras, e esses produtos podem ser classificados em duas categorias. Uma delas é a produção de compostos essenciais a todos os seres vivos, chamados de metabólitos primários ou macromoléculas, que são as proteínas, lipídios e glicídios. A transformação desses metabólitos primários origina o segundo grupo, conhecido como metabólitos secundários ou micromoléculas, os quais são encontrados em apenas determinados grupos de plantas, geralmente em concentrações baixas. Os metabólitos secundários têm importantes funções para as plantas, tais quais atuar como toxinas e dissuasórios alimentares, com o propósito de defesa, e atrair polinizadores, a fim de assegurar sua reprodução (POSER, 2017). Segundo Shakya e colaboradores (2017), quando a planta detecta sinais de perigo através de seus sensores e receptores, ativa resposta de defesa, incluindo o metabolismo secundário. Uma série de fatores pode induzir resposta de defesa nas

plantas, como agentes biológicos (componentes de paredes celulares microbianas), agentes químicos (metais pesados) e agentes físicos (radiação ultravioleta (UV), ozônio, estresse hídrico e osmótico) (SHAKYA *et al.*, 2017). Dessa forma, supõe-se que a radiação gama poderia também atuar como um indutor da síntese de metabólitos secundários.

Um dos mais importantes grupos de compostos secundários são os polifenóis, dada sua rica distribuição em plantas das mais variadas espécies e dos efeitos benéficos que lhes são atribuídos. Os polifenóis podem ser divididos em subgrupos – ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanas e estilbenos, sendo comum a todos a presença de anel aromático com pelo menos duas hidroxilas como substituintes em sua estrutura (BUBOLS, 2013).

Os metabólitos secundários, compostos com estruturas e atividades variadas e complexas, além de desempenharem importantes funções para as plantas também apresentam notáveis propriedades farmacológicas. Aos polifenóis são relatadas atividades anti-hipertensiva, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, cardioprotetora (VOGEL *et al.*, 2015) e antineoplásica (FERRUELO *et al.*, 2014). Aos flavonoides atribui-se a capacidade de modular a atividade de enzimas e interferir em sistemas celulares (GRANATO *et al.*, 2013), e assim exercer papel anti-inflamatório, antioxidante (ABDALLAH & ESMAT, 2017), gastroprotetor (ALI KHAN *et al.*, 2017), neuroprotetor (RAMALINGAYYA *et al.*, 2017), entre outros. Salienta-se o grande significado desses metabólitos na busca por compostos terapêuticos e a necessidade da sua preservação nos vegetais após processamento.

## 1.2 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

Casos de toxicidade relacionados às plantas medicinais são comuns, principalmente devido à ideia de que, por ser natural, o uso medicinal de plantas é seguro; o fato de o paciente ocultar do médico e/ou farmacêutico o uso de uma planta como medida terapêutica, por considerar ser “apenas um chá”, podendo vir a usar um medicamento que tenha interação medicamentosa com a planta e cause um efeito deletério; e a existência de grande número de produtos falsificados e de má qualidade no mercado. Por considerar que as plantas são inofensivas e não causam danos à saúde, por vezes, não há associação entre a utilização dessas e possíveis efeitos colaterais que ocorram após o uso das mesmas. Deste modo, é grande o número de casos de toxicidade não notificados, o que torna bastante difícil precisar um número de ocorrências (NEEGHEEN-BHUNJUN, 2013).

Rodrigues e colaboradores (2011) salientam que as plantas podem ter efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos, entre elas o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) que é abortivo, o boldo (*Vernonia condensata*) que é embriotóxico e a hortelã (*Mentha piperita*) que é teratogênica. Entretanto para a maioria das plantas não há dados a respeito do uso na gravidez e os dados existentes são escassos e contraditórios. Castro (2006) também relata a toxicidade de algumas plantas, como o coentro (*Coriandrum sativum* L.), o qual, se usado em grandes doses, pode causar lesões renais, o confrei (*Symphytum officinale* L.), que pode ser hepatotóxico e carcinogênico, o cravo da índia (*Syzygium aromaticum* L.), quando usado em excesso ocasiona irritação gástrica e queimadura nas mucosas, e o funcho (*Foeniculum vulgare* Mill) que se usado em concentração superior a 20 g/L pode ser convulsivante.

Foi relatado que *Aloe*, gênero conhecido por ter propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e antienvelhecimento, muito utilizado com fins medicinais, é responsável por induzir hepatotoxicidade. Em um dos casos descritos, uma mulher de 57 anos fez uso de comprimidos com 250 mg de extrato de *Aloe arborescens* e 28,5 mg de extrato de *Aloe vera* durante seis meses. Os exames laboratoriais dessa paciente revelaram atividades elevadas das enzimas alanina aminotransferase (ALT) (565 U/L), aspartato aminotransferase (AST) (331 U/L) e fosfatase alcalina (ALP) (309 U/L), para as quais se tem os seguintes valores considerados normais: ALT até 31 U/L, AST até 32 U/L e ALP de 65 a 300 U/L. A administração dos comprimidos foi interrompida, e, doze dias após a descontinuação, a atividade da ALT chegou ao seu maior nível (926 U/L), diminuindo gradualmente à dosagem normal com o passar de várias semanas (YANG *et al.*, 2010; BELO HORIZONTE, 2016).

Sendo assim, verifica-se a importância dos testes para avaliação da toxicidade e para auxiliar no uso seguro das plantas, em função de que elas podem ser consideradas inofensivas, mas ainda assim ocultarem graves efeitos, e o fato de, na maioria das vezes, a toxicidade estar relacionada com a dose na qual a planta é administrada.

A resolução nº 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) orienta a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, indicando que devem ser feitas avaliações de toxicidade aguda e de doses repetidas (ANVISA, 2004).

### **1.2.1 Toxicidade oral aguda e de dose repetida**

A avaliação da toxicidade das plantas pode ser realizada através de diferentes protocolos, entre os quais os guias da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*)

ganham destaque por serem aceitos mundialmente como métodos padrão para testes de segurança. Para o estudo da toxicidade oral aguda, um dos mais empregados é a diretriz 423 – Método da classe tóxica aguda, que utiliza doses pré-definidas – 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg, sendo a dose inicial escolhida aquela que se espera ocasionar a morte de um dos animais. A substância teste é classificada em categorias baseada na identificação da dose que causa mortalidade, não objetivando obter uma dose letal média (LD<sub>50</sub>) precisa. Esse guia tem a vantagem de ser reprodutível e utilizar poucos animais (OECD, 2001a; OECD, 2001b). A dose selecionada para o presente estudo foi a mais alta (2000 mg/kg), sendo a mais propensa a causar mortalidade, uma vez que, fundamentado em estudos anteriores, não se espera que as doses mais baixas ocasionem tal efeito (SACHDEWA *et al.*, 2001; KANDHARE *et al.*, 2012).

A toxicidade de dose repetida das plantas pode ser analisada através do guia 407 da OECD – Estudo de toxicidade oral de dose repetida de 28 dias em roedores, que tem como princípio a administração oral diária de doses graduadas a diferentes grupos de tratamento, sendo uma dose por grupo, administrada durante 28 dias. Pelo menos dez animais, 5 fêmeas e 5 machos, devem ser utilizados por grupo, havendo no mínimo três grupos de teste (OECD, 2008). Para esse estudo foram escolhidas as doses 100, 200 e 400 mg de CELH/kg de peso corporal, as quais foram selecionadas baseado em estudos prévios (SACHDEWA *et al.*, 2001; KANDHARE *et al.*, 2012; ATEBA *et al.*, 2014).

### 1.3 IRRADIAÇÃO

A indústria farmacêutica é muito rigorosa em relação à qualidade da matéria-prima utilizada, sendo a análise microbiológica do material empregado um dos principais quesitos avaliados, fazendo-se indispensável a utilização de técnicas de descontaminação. Para isso, utiliza-se o processo de esterilização total ou somente diminuição da carga microbiana inicial, através de métodos químicos (como o da fumigação com óxido de etileno) e físicos (tal qual a irradiação). A irradiação pode empregar diferentes fontes, como raios gama, raios x e feixes de elétrons, e também variadas doses, dependendo do objetivo (SANTOS, 2008; PEREIRA *et al.*, 2016).

Em 2001, a ANVISA aprovou a resolução RDC nº 21, constando o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Esse preconiza que a irradiação não deve ser utilizada em substituição as boas práticas de fabricação e/ou agrícolas e que qualquer alimento pode ser tratado por radiação, desde que a dose mínima absorvida seja suficiente para alcançar o

objetivo proposto e a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou atributos sensoriais do alimento (ANVISA, 2001).

A radiação ionizante vem sendo aplicada em diversos produtos como método de conservação e descontaminação, e sugere-se que a radiação gama de Cobalto 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) é a opção mais eficiente quando trata-se de produtos vegetais (SANTOS, 2008; SILVA, 2010). Radiação ionizante é a radiação transmitida por partículas de alta energia (partículas alfa, prótons, elétrons) ou ondas eletromagnéticas (raios x, raios gama) que possuem energia suficiente para remover elétrons de valência de um átomo, produzindo conseqüentemente a sua ionização. Os raios gama são ondas eletromagnéticas (fótons) de alta energia, sem carga elétrica e sem massa, portanto, extremamente penetrantes, produzidos em processos nucleares, como a fissão nuclear e o decaimento de radioisótopos (PINO & GIOVEDI, 2005).

Entre as vantagens desta técnica destacam-se não ser necessária a utilização de calor e os materiais poderem ser esterilizados embalados, eliminando assim o risco de nova contaminação após a realização do procedimento (PINO & GIOVEDI, 2005). Ressalta-se que o processo de irradiação não aumenta o nível normal de radioatividade da planta, independente do tempo durante o qual o produto é exposto à radiação, uma vez que ele não entra em contato direto com a fonte radioativa, e sim com a energia emitida pela fonte (SILVA, 2010).

Um dos equipamentos que tem o  $^{60}\text{Co}$  como fonte de radiação é o Theratron 780C (figura 2-B), utilizado nesse trabalho para irradiação do extrato bruto das folhas de *H. rosa-sinensis*. Esse equipamento é empregado também no tratamento de pacientes com câncer, utilizando o princípio da teleterapia, que é quando a fonte de radiação está posicionada distante do tecido neoplásico (cerca de 80 a 100 cm). O Theratron 780C é usado principalmente na radioterapia de tumores profundos, como câncer de pulmão, colo do útero, bexiga e próstata. De modo geral, o tratamento consiste em doses de 2 Grays (Gy) administradas em várias sessões de 1 a 2 minutos, totalizando uma dose de 20 a 60 Gy (NANDI, 2004).

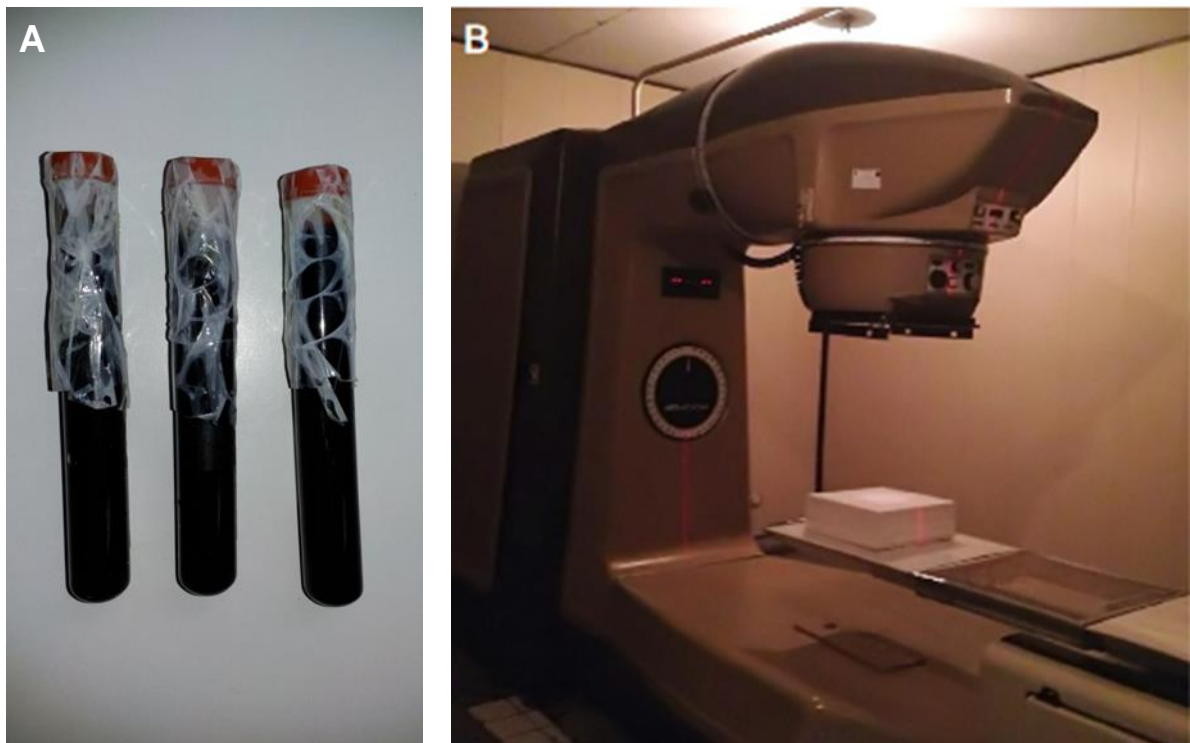
Para os alimentos e plantas utilizam-se doses muito maiores do que as usadas no tratamento de neoplasias humanas. Para a descontaminação e conservação de alimentos, dose de até 1 quilogray (kGy) é considerada baixa, sendo suficiente para inibir brotamentos, atrasar maturação, desinfestação e inativação de parasitas; irradiação de dose média (1 kGy a 10 kGy) é eficiente para diminuir o número de microorganismos decompositores e redução ou eliminação de patógenos não formadores de esporos; e irradiação de dose alta (acima de 10



kGy) é capaz de reduzir o número de microorganismos ao ponto de esterilidade (SILVA, 2010).

Ao avaliar os efeitos da radiação gama (1 e 10 kGy) na cor, composição química e atividade antioxidante do extrato das folhas de *Ginkgo biloba*, Pereira e colaboradores (2015) constataram que a dose de 1 kGy é a ideal para manter o perfil nutricional da planta, proteger moléculas específicas e aumentar a atividade antioxidante da infusão e extratos metanólicos preparados a partir de suas folhas. Assim, essa foi a dose de radiação selecionada para o presente estudo, no qual parte do extrato bruto obtido das folhas do hibisco foi acondicionado em tubos de vidro (figura 2-A), que foram completamente vedados e imersos em água para passar pelo processo de irradiação. Quando o material é irradiado estando totalmente imerso, a radiação é espalhada pela água e atinge o ponto irradiado por todos os ângulos (OMI, 2006).

Figura 2 – A. Extrato bruto das folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* acondicionado em tubos de vidro. B. Irradiador Theratron 780C.



Fonte: Autora; NAJAFI *et al.*, 2017.

Silva (2011) avaliou o efeito da esterilização por radiação gama na camomila (*Chamomilla recutita* L. Rauschert), utilizando doses de radiação de 1; 3; 5 e 20 kGy. A análise do perfil cromatográfico da planta por cromatografia gasosa revelou que com o

aumento da dose de radiação ocorreram mudanças no perfil, pois houve variação da quantidade de substâncias encontradas em cada extrato, com a degradação de certos compostos e possivelmente o surgimento ou aumento nos níveis de outros. Com isso, observa-se que ao realizar o controle de qualidade microbiológico através da irradiação, outros compostos presentes nos vegetais também podem ser afetados. Portanto, são fundamentais estudos para avaliar o emprego desse método a fim de prevenir eventuais alterações na matéria-prima.

#### 1.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Outro estudo relevante, tratando-se de produtos naturais, é a determinação da capacidade antioxidante dos mesmos. Radicais livres são espécies produzidas fisiologicamente no metabolismo normal das células, em processos inflamatórios, isquemia e durante a prática de atividade física, além disso, há algumas causas externas, como tabagismo, drogas e poluentes, que favorecem a sua produção (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Por possuírem um ou mais elétrons não pareados na sua camada de valência, essas espécies são muito reativas e instáveis. Na tentativa de estabilizar-se, retiram elétrons de moléculas próximas, causando-as danos (GARG *et al.*, 2012). A fim de combater os radicais livres, os organismos vivos sintetizam substâncias capazes de regenerar ou prevenir danos oxidativos, chamados antioxidantes endógenos. Essas defesas podem também ser adquiridas de fontes externas, como alimentos e bebidas, sendo estes antioxidantes exógenos (ALVES *et al.*, 2010).

Em condições normais, a produção das espécies reativas é equilibrada pela ação dos sistemas antioxidantes de defesa. Porém, quando as concentrações de radicais livres tornam-se maiores que as de antioxidantes, acontece o estresse oxidativo, evento caracterizado pelo desequilíbrio entre os compostos capazes de causar dano e aqueles protetores do organismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Moléculas de proteína, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), glicídios e lipídios são as mais afetadas pelas espécies reativas, e está bem descrito na literatura que esses danos estão associados à vasta gama de patologias, como distúrbios neurológicos, neurodegenerativos e cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus e suas complicações, artrite reumatoide, entre outras (ALAM *et al.*, 2013; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Dessa forma, uma opção para prevenir essas doenças pode ser a ingestão de alimentos com antioxidantes. Algumas dessas substâncias sintéticas utilizadas industrialmente, como o

hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA), têm sido relacionadas a lesões hepáticas e desenvolvimento de câncer, intensificando a busca por compostos naturais, que sejam não tóxicos ao organismo e tão eficazes quanto os sintéticos. Diversas substâncias antioxidantes estão presentes nas plantas, entre as quais se destacam o ácido ascórbico, tocoferóis, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides e minerais, como selênio e zinco. Eles apresentam diferentes mecanismos de ação e agem em variados radicais, por isso uma combinação de substâncias antioxidantes pode ser mais eficaz e apresentar melhores resultados do que se utilizado um composto isoladamente (KRISHNAIAH *et al.*, 2011; ALAM *et al.*, 2013; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Um método preciso, rápido, simples, econômico e útil para determinar a habilidade de uma substância em capturar radicais livres *in vitro* é o procedimento fundamentado na eliminação do 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH). Esse composto é um radical livre orgânico que possui cor púrpura e absorção a 515-520 nm. Quando um composto antioxidante doa elétron ou átomo de hidrogênio a esse radical, ocorre a sua redução, passando a apresentar cor amarelo-pálido e uma menor absorbância, que pode ser medida espectrofotometricamente. O resultado pode ser expresso como valor de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória 50), definida como a concentração de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50%, a qual é determinada por meio da representação gráfica da inibição percentual do radical DPPH em função da concentração do antioxidante (OLIVEIRA, 2015).

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda e subaguda (28 dias) do extrato bruto das folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* Linn., bem como analisar o efeito da radiação gama de <sup>60</sup>Co nos níveis de constituintes, atividade antioxidante e toxicidade do extrato dessa planta.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Quantificar polifenóis totais e flavonoides presentes nas folhas de *H. rosa-sinensis* Linn.
- Identificar e quantificar compostos das folhas da planta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto não irradiado e irradiado das folhas de *H. rosa-sinensis* Linn.
- Avaliar a toxicidade oral aguda *ex vivo* do extrato bruto não irradiado e irradiado das folhas de *H. rosa-sinensis* Linn. em ratos.
- Avaliar a toxicidade oral subaguda *ex vivo* do extrato bruto não irradiado e irradiado das folhas de *H. rosa-sinensis* Linn. em ratos.
- Comparar os resultados obtidos nos testes com o extrato não irradiado e irradiado e analisar as possíveis alterações causadas pela radiação gama.

## 2 MANUSCRITO

Essa dissertação tem os seus materiais e métodos e resultados estruturados na forma de um artigo científico, de acordo com as normas da revista científica selecionada para a submissão do mesmo.

### 2.1 SAFETY EVALUATION (ACUTE AND SUBACUTE STUDIES) OF NON-IRRADIATED AND IRRADIATED CRUDE EXTRACT OF *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. LEAVES IN WISTAR RATS

Este manuscrito foi submetido à Revista *Journal of Ethnopharmacology*.

#### SAFETY EVALUATION (ACUTE AND SUBACUTE STUDIES) OF NON-IRRADIATED AND IRRADIATED CRUDE EXTRACT OF *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. LEAVES IN WISTAR RATS

Fernanda Ziegler Reginato<sup>a</sup>, Camille Gaube Guex<sup>a</sup>, Juliana Calil Brondani<sup>b</sup>, Kássia Caroline Figueredo<sup>a</sup>, Roberta da Silva Jesus<sup>b</sup>, Patrícia Romualdo de Jesus<sup>a</sup>, Edimara Machado Lopes<sup>a</sup>, Ana Martiele Engelmann<sup>c</sup>, Fernanda Brum Pires<sup>b</sup>, Gilberti Helena Hübscher Lopes<sup>d</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Postal address: Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900

E-mail address of authors: fernanda\_zr@yahoo.com.br, camilleguex@yahoo.com.br, juliana.brondani@gmail.com, kassia.tquimica@yahoo.com.br, robertasj@hotmail.com, patriciardejesus@gmail.com, dida\_lopez@hotmail.com, anamartiele@gmail.com, fernandabrumpires@gmail.com, gilberti@gilbertinutri.com.br, lgfbauermann@gmail.com

Corresponding author: Fernanda Ziegler Reginato

E-mail: fernanda\_zr@yahoo.com.br

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, RS.

Telefone: (55) 3220 9380

## **Abstract**

*Ethnopharmacological relevance:* *Hibiscus rosa-sinensis* Linn., popularly known as hibiscus, “hibisco-da-china” and “mimo-de-vênus”, is a plant widely spread and easily found in tropical and subtropical regions of the world. Its leaves are used in traditional medicine as hair growth promoters, to improve digestion and as an antidiarrheal, to promote drainage of abscesses, to stimulate menstrual flow, treatment of pain, fatigue and skin diseases.

*Aim of the study:* To evaluate the safety of the acute and subacute oral use of the crude extract of the leaves of *H. rosa-sinensis* Linn. (CELH), as well as to investigate the effect of the gamma radiation on this extract.

*Materials and Methods:* Part of the CELH obtained was subjected to <sup>60</sup>Co gamma radiation at a dose of 1 kGy. In acute study, non-irradiated and irradiated crude extract were administered orally in a single dose (2000 mg/kg) to female *Wistar* rats, whereas in the subacute study, male and female *Wistar* rats were treated at doses of 100, 200 and 400 mg/kg, during 28 days. Biochemical and hematological parameters and body weight and organs of the animals were evaluated. The extracts were also submitted to the determination of antioxidant activity and chemical constituents by HPLC-UV.

*Results:* The crude extract presented remarkable antioxidant activity, which was potentialized by gamma radiation, which caused a decrease in the concentration of compounds present in CELH, including the maslinic acid, constituent identified by HPLC-UV. Body weight and relative organs weight values were not altered with treatment, as well as biochemical and hematological indices did not demonstrate clinically important variations, except for an increase in the blood levels of triglycerides and glucose.

*Conclusions:* Our results indicate that CELH does not cause hepato or nephrotoxicity nor signs of systemic toxicity, being safe when used in the conditions applied in this work. Gamma radiation did not interfere in the absence of toxicity presented by the extract and may be useful to potentiate therapeutic properties of the hibiscus.

**Keywords:** *Hibiscus rosa-sinensis*; Oral toxicity; Medicinal plants; Safety assessment; Gamma radiation; Rats.

Chemical compounds studied in this article: Maslinic acid (PubChem CID: 73659).

## 1 Introduction

Brazil has a valuable biodiversity, possessing the greatest variety of flora and fauna in the world, with 15 to 20% of the total number of species on the planet. In addition, the Brazilian population consists of a wide variety of ethnicities and cultures, resulting in a knowledge about the planting, cultivation and consumption of natural products for therapeutic purposes (Brasil, 2016). This practice has a very ancient origin, being a source of treatment and cure of diseases for millennia, and it is estimated that 80% of the world population have plants as the first option for healthcare (Brasil, 2015).

Although many medicinal plants help in the prevention and treatment of diseases, they can trigger toxic processes to the human organism. Thus, it is advised that the consumption of such products to be based on studies that prove their efficacy and absence of toxicity (Rivas *et al.*, 2013). Moreover, the innocuity of such products is essential, since contaminants such as fungi and bacteria can compromise the safety associated with their use. A widely used method for the decontamination, disinfection, preservation and increase of the quality of the plants is irradiation, physical process that does not use high temperatures and presents benefits like not using chemical products and, therefore, not leaving chemical residues in the product, the plant can be consumed immediately after processing, as well as being effective against a broad

spectrum of bacteria, insects and other contaminants, prolonging shelf life of the product (Pereira *et al.*, 2016a; Roberts, 2014).

*Hibiscus rosa-sinensis* Linn., a plant of the Malvaceae family, is a bush native to tropical Asia, however, it has spread and can now be easily found in tropical and subtropical regions of the world. Known as hibiscus, “hibisco-da-china” and “mimo-de-vênus”, it can reach 3m in height and has large flowers in various colors. Numerous therapeutic properties are attributed to different parts of the plant, such as leaves, flowers and roots, which are used in popular medicine mainly in the form of infusions (Goldberg *et al.*, 2017; Nath and Yadav, 2016; Silva *et al.*, 2016). Among the traditional uses of the leaves are the promotion of hair growth, to improve digestion and antidiarrheal, to promote drainage of abscesses, to stimulate menstrual flow, as well as the treatment of pain, fatigue and skin diseases (Jadhav *et al.*, 2009; Kumar and Singh, 2012).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the safety of acute and subacute use of the crude extract of the leaves of *H. rosa-sinensis* (CELH), as well as to investigate the effect of gamma radiation on this plant.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Plant material and obtention of extract

Leaves of *H. rosa-sinensis* were collected in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, in April 2015 (coordinates 29°42'10.1"S and 53°50'52.6"W). The plant was identified in the herbarium of the Department of Biology at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), and a voucher specimen was deposited for reference purposes under registration number 15440-SMDB (Santa Maria Department of Biology).

Leaves of *H. rosa-sinensis* were dried in a circulating air oven at 40 °C and reduced to the powdered in a knife mill. The powder was then submitted to hydroalcoholic maceration with ethanol 70% at room temperature for 28 days with daily agitation. During this period, the solvent of the maceration was renewed four times for the total extraction of the metabolites of the leaves. Posteriorly, the contents were filtered, obtaining the hydroalcoholic extract, which was concentrated in a rotary evaporator and lyophilized to obtain the crude extract (CELH). The CELH was stored in an air-protected container at a temperature of approximately 4 °C. The extraction yield obtained was 21.92% (Yield (%) = (mass of the extract/mass of the plant material) x 100).

## *2.2 Irradiation of crude extract*

Part of CELH was irradiated with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays at a dose of 1 kGy. The extract was placed in glass tubes, which were sealed properly and immersed in water. This procedure was performed in the radiotherapy sector of the University Hospital of Santa Maria (HUSM) of UFSM, using Theratron 780C irradiator. Scientific Commission of the Management of Teaching and Research of HUSM approved this work under the number 095/2015.

CELH irradiated (CELH-Ir) and non-irradiated (CELH-NIr) were subjected to the same tests in order to evaluate if exposition to gamma radiation causes alteration in the constituents of the plant and in the possible toxic effect developed by it.

## *2.3 Chemical and reagents*

All chemical were of analytical grade. Solvents for the extractions and analytical procedures were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Maslinic acid, gallic acid, ascorbic acid and rutin were acquired from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA). The ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) system.

## *2.4 Determination of total polyphenols content*

The total polyphenol content was performed by the Folin–Ciocalteu method with slightly modifications performed by Chandra and Meija (2004). The samples were read at 730 nm in spectrophotometer. The assay was performed with CELH-NIr and CELH-Ir, in triplicate, and the total polyphenol content was expressed in milligrams gallic acid equivalent (GAE)/g dry fraction. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid in the range of 0.005 - 0.030 mg/mL was  $y = 15.635x + 0.0194$  ( $r = 0.9671$ ). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

## *2.5 Determination of total flavonoids content*

The determination of the flavonoid content followed the method described by Woisky and Salatino (1998), which uses  $\text{AlCl}_3$  2% solution and spectrophotometer reading at 420 nm.



The assay was performed with the CELH-NIr and CELH-Ir, in triplicate. The flavonoid content was calculated by the equation  $y = 4.2561x + 0.0052$  ( $r = 0.9999$ ), obtained from the analytical curve elaborated in the range of 0.012 to 0.200 mg/mL, using rutin as standard. The results were expressed as milligrams rutin equivalent (RE)/g dry fraction and presented as mean  $\pm$  standard deviation.

### 2.6 Radical-Scavenging Activity – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

The evaluation of the antioxidant capacity by the colorimetric method of DPPH was performed as described by Choi et al. (2002). The CELH-NIr and CELH-Ir were evaluated at concentrations of 250; 125; 62.5; 31.25; 15.62 and 7.81  $\mu$ g/mL. Each sample was mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the absorption was measured at 518 nm. A solution of DPPH (1 mL, 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control. The test was performed in triplicate and the percent inhibition of the DPPH radical was calculated by the equation described:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \{[(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100\}$$

Where:  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  is absorbance of CELH;  $\text{Abs}_{\text{blank}}$  is absorbance of CELH without adding the DPPH;  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is absorbance the solution of DPPH in ethanol.

After calculation of inhibition of DPPH radical in percentage, it was produced an inhibition percentage graphic versus the concentration of the extract used, having as standard the ascorbic acid. The  $\text{IC}_{50}$  (concentration of extract ( $\mu$ g/mL) capable of inhibiting 50% of the DPPH activity) of the extracts was calculated by the equation of the line. The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

### 2.7 Analysis of apolar compounds by HPLC-UV

To identify and quantify the apolar compounds present in the CELH-NIr and CELH-Ir was used the method described by Schmidt (2016), which uses reverse phase chromatography with ultraviolet detection (UV-Vis). The chromatographic system Dionex used has pump P680 model, UVD-170 detector and manual injection with handle of 100  $\mu$ L. The chromatographic separation was carried out with a C18 Kinetex – 250 mm x 4.6 mm (Phenomenex), packed with 5  $\mu$ m diameter particles, with precolumn of the same nature. The

isocratic elution was conducted using mobile phase consists of acetonitrile and tetrahydrofuran in the proportion of 90:10. The flow used was 0.5 mL.min<sup>-1</sup> and the peaks were detected at 210 nm. Chromatographic operations were performed in triplicate at room temperature.

## 2.8 *Animals*

Male (170-210 g) and female (120-150 g) *Wistar* rats were obtained from Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. The animals were acclimatized to the standard local conditions for one week prior to the experimental trials and maintained at a controlled temperature of 22 ± 2 °C, with a 12:12 h light/dark cycle and had free access to the standard food of rodents and clean drinking water. All the procedures used in the present study were approved by the Comitê de Ética no Uso de Animais of our university under the number 5306210116.

## 2.9 *Acute oral toxicity*

The acute oral toxicity study was performed according to OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) guideline 423 (OECD, 2001). Healthy female rats were divided into three groups of three animals each. To the first group was administered distilled water, to the second and third group was administered CELH-NIr and CELH-Ir, respectively, at a single dose of 2000 mg/kg. Prior to treatment, the animals were fasted overnight with free access to water. The crude extract was solubilized in fresh distilled water immediately prior to administration. Water and extract solutions were administered by oral gavage, respecting the volume of administration of 1 mL/100 g body weight.

After the administration, activity and coordination of the motor system, autonomic central and peripheral nervous systems activities, behavioral changes and possible mortality were observed during the first 30 minutes, periodically during the first 24 hours and, thereafter, daily during 14 days. The weight of each animal was determined shortly before the test substance was administered and daily during the study period.

After 14 days, animals were fasted overnight (with free access to water) and anesthetized with thiopental (25 mg/kg, intraperitoneally – i.p), associated with lidocaine hydrochloride (10 mg/mL). Blood was collected by cardiac puncture followed by euthanasia with deepening of the anesthetic thiopental (150 mg/kg ip). Blood samples collected with and

without anticoagulant ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) were used for the analysis of hematological and biochemical parameters, respectively. Kidneys and liver were removed for macroscopic analysis in order to evaluate possible changes in the structure, stiffness or coloring of surfaces. The determination of acute oral toxicity was performed in duplicate.

### 2.10 *Sub-acute oral toxicity*

Assessment of oral toxicity after repeated doses for 28 days followed OECD guideline 407 (OECD, 2008). Male and female *Wistar* rats were distributed in 7 groups of 10 animals each (5 male and 5 female, n=70). To the group 1 (control group) was administered distilled water, groups 2-4 was administered CELH-NIr at doses of 100, 200 and 400 mg/kg, respectively, while to the groups 5-7 was administered CELH-Ir at the same doses (100, 200 and 400 mg/kg, respectively). The doses were selected based on previous studies (Sachdewa *et al.*, 2001; Kandhare *et al.*, 2012; Ateba *et al.*, 2014).

The crude extracts were solubilized in fresh distilled water prior to administration. The administrations were performed in the morning, every 24 hours, in a volume of 1 mL/100 g body weight, by oral gavage for 28 days. During this period the animals were subjected to careful observation to detect possible changes in behavior and signs of toxicity such as salivation, lethargy, diarrhea, tremors, convulsions and mortality. Animal weight and food intake were monitored every 3 days. After 24 hours of the last administration, the animals were euthanized according to the procedure described previously in section 2.9. The collected blood was used for assessment of hematological and biochemical parameters.

#### 2.10.1 *Organ weights*

After the euthanasia, heart, spleen, liver and kidneys were removed, weighed and the relative weights calculated (organ weight (g)/100 g body weight).

#### 2.10.2 *Delta-aminolevulinate dehydratase activity ( $\delta$ -ALA-D)*

A fragment from kidney and liver from each animal were homogenized in Tris/HCl 50 mM buffer (pH 7.4). The homogenates were centrifuged and the supernatant was used to determine the activity of the enzyme delta-aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) according to the modified method described by Sassa (1982), which is based on spectrophotometric

measurement at 555 nm of the porphobilinogen formed during one hour of incubation at 37 °C after addition of the delta-aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA) substrate.

### 2.11 *Blood analysis*

An aliquot of the blood was transferred to a tube containing K2-EDTA anticoagulant (BD Vacutainer®) and used for hematological evaluation of the following parameters: red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT), plasma proteins (PP), total leukocytes (WBC) and differential counts of leukocytes (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils), by using an automatic veterinary counter Mindray BC 2800.

Blood was also transferred to a dry tube (BD Vacutainer®) and centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. The serum obtained was carefully separated and used to determine glucose (GLU), total cholesterol (CHOL), triglycerides (TRIG), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), total protein (TP) levels and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, by using a semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000) and commercially available test kits (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil).

### 2.12 *Statistical analysis*

Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. (standard deviation). The results were analyzed using Student's t-test and by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey *post-hoc* test. Kruskal-Wallis and Dunn's were used as statistic tests when the requirements to perform a parametric test were not satisfied. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software, version 6.01 (GraphPad software, Inc.).

## **3 Results**

### 3.1 *DPPH assay, total polyphenols and flavonoids content*

The dosage of total polyphenols and flavonoids as well as the IC<sub>50</sub> determined by the DPPH method are shown in Table 1. In the study of the antioxidant activity, IC<sub>50</sub> in both

extracts was low, with IC<sub>50</sub> of CELH-Ir almost 50% lower than that of CELH-NIr, indicating high elimination activity of DPPH radical. In the quantification of the secondary metabolites, a reduction in the flavonoid levels in the CELH-Ir was observed in relation to the CELH-NIr, which also occurred in the quantification of total polyphenols, although less pronounced.

Table 1- Total polyphenols (PT) content and total flavonoids (FT) in CELH. 50% Inhibitory Concentration (IC<sub>50</sub>) determined by DPPH method.

	CELH-NIr	CELH-Ir
PT	79.99 ± 1.04	73.12 ± 4.00 <sup>a</sup>
FT	16.28 ± 0.70	5.10 ± 0.24 <sup>a</sup>
IC50	368.24 ± 34.51	199.63 ± 23.51 <sup>a</sup>

Results are presented as mean ± S.D. Student's t-test (n=3). PT expressed on mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry fraction, FT on mg rutin equivalent (RE)/g dry fraction and IC<sub>50</sub> on µg/mL. The values were considered to be significantly different when p < 0.05. (a) Different from the CELH-NIr group.

### 3.2 Analysis of apolar compounds by HPLC-UV

The identification and quantitative analysis of compounds of CELH-NIr and CELH-Ir by HPLC-UV revealed the presence of four compounds in both extracts, however, only was identified, the maslinic acid, which presented concentration of 7.90 mg/g in the CELH-NIr and 7.23 mg/g in the CELH-Ir, showing a reduction in the concentration of 8.5% in the irradiated extract compared to the non-irradiated extract.

### 3.3 Acute oral toxicity

Single administration at the dose of 2000 mg/kg of CELH-NIr and CELH-Ir did not cause changes in activities, coordination or behavior of the animals, besides the absence of mortality and signs of toxicity in the kidneys and liver after euthanasia. The effects of this treatment on the weight of the animals are presented in Table 2, no statistical difference was detected in the initial and final weight among the animals of the different groups.

The results of the biochemical and hematological parameters are described in Tables 3 and 4, respectively. There was a reduction in the MCHC of the groups treated with the extract, whether irradiated or not, in relation to the control group, and a decrease in the relative

monocyte count in the group to which CELH-Ir was administered in relation to the CELH-NIr group. Regarding the biochemical parameters, no significant differences were observed.

Table 2- Effect of single dose oral of CELH on body weight of females rats

Parameters	Group		
	Control	2000 mg/kg CELH-NIr	2000 mg/kg CELH-Ir
Initial body weight (g)	147.00 ± 12.75	137.20 ± 10.71	144.80 ± 11.92
Final body weight (g)	199.00 ± 8.31	190.80 ± 11.37	190.00 ± 10.86
Body weight gain (g)	52.00 ± 7.87	53.60 ± 10.11	45.20 ± 10.73
Body weight gain (%)	26.11 ± 3.56	27.93 ± 4.14	23.76 ± 5.29

Results are presented as mean ± S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=6). No significant differences were observed.

Table 3- Biochemical parameters of females rats treated orally with CELH at single dose of 2000 mg/kg

Parameters	Group		
	Control	2000 mg/kg CELH-NIr	2000 mg/kg CELH-Ir
ALT (U/L)	39.80 ± 2.86	42.60 ± 5.86	39.40 ± 7.76
AST (U/L)	81.56 ± 7.55	76.32 ± 8.31	88.96 ± 10.82
TP (mg/dL)	5.68 ± 0.23	5.66 ± 0.45	6.22 ± 0.45
BUN (mg/dL)	48.26 ± 4.68	47.88 ± 6.85	56.86 ± 6.34
CRE (mg/dL)	0.48 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.50 ± 0.07
GLU (mg/dL)	160.00 ± 20.07	179.70 ± 14.54	149.20 ± 25.04
TRIG (mg/dL)	60.20 ± 7.46	61.20 ± 5.85	61.20 ± 9.36
CHOL (mg/dL)	93.00 ± 9.08	90.80 ± 5.40	86.00 ± 10.17

Results are presented as mean ± S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=6). Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), glucose (GLU), triglycerides (TRIG) and total cholesterol (CHOL). No significant differences were observed.

Table 4- Hematological parameters of females rats treated orally with CELH at single dose of 2000 mg/kg

Parameters	Group		
	Control	2000 mg/kg CELH-NIr	2000 mg/kg CELH-Ir
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.23 $\pm$ 0.23	8.11 $\pm$ 0.27	8.13 $\pm$ 0.21
HGB (g/dL)	15.20 $\pm$ 0.73	14.46 $\pm$ 0.54	14.58 $\pm$ 0.38
HCT (%)	48.60 $\pm$ 2.78	47.94 $\pm$ 2.14	47.86 $\pm$ 1.17
MCV (fL)	59.04 $\pm$ 1.90	59.18 $\pm$ 1.45	58.96 $\pm$ 0.97
MCHC (g/dL)	31.24 $\pm$ 0.49	30.12 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	30.38 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	972.80 $\pm$ 68.95	1005.00 $\pm$ 70.49	1037.00 $\pm$ 42.34
PP (mg/dL)	6.56 $\pm$ 0.26	6.64 $\pm$ 0.38	6.88 $\pm$ 0.30
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	7.74 $\pm$ 1.73	6.82 $\pm$ 1.08	5.74 $\pm$ 0.92
Neutrophils (%)	16.20 $\pm$ 4.32	23.20 $\pm$ 2.49	20.40 $\pm$ 6.19
Lymphocytes (%)	79.20 $\pm$ 4.76	71.60 $\pm$ 3.91	77.20 $\pm$ 6.30
Monocytes (%)	2.20 $\pm$ 0.84	2.40 $\pm$ 0.89	0.60 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>
Eosinophils (%)	2.40 $\pm$ 1.14	2.20 $\pm$ 0.84	1.80 $\pm$ 0.84
Basophils (%)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

Results are presented as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=6). Red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT), plasma protein (PP) and total leukocytes (WBC). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . (a) Different from the control group. (b) Different from the CELH-NIr group.

### 3.4 Sub-acute oral toxicity

During the 28 days of treatment, no signs of toxicity (physiological, behavioral changes or mortality) were observed in both female and male rats. Table 5 shows the initial and final weights, weight gain and food intake. There was no change in any of these parameters. In both sexes, no changes were observed in the organs analyzed macroscopically, and no significant differences were found between the relative weights of these organs in the rats of the different groups (Table 6).

Analysis of the biochemical parameters (Table 7) shows that subacute administration of CELH-Ir at the dose of 200 mg/kg to male rats caused a significant reduction in ALT

activity compared to the control group. In addition, a significant reduction in AST activity was observed in animals of the group 400 mg/kg CELH-Ir when compared to other groups. No changes were observed in ALT and AST activities of the female rats among the different treatments. Male rats of the groups CELH-Ir at doses of 100 and 200 mg/kg showed a significant increase in serum total protein dosage in relation to groups CELH-NIr at doses of 100 and 400 mg/kg. No statistical difference was observed in female rats.

Analysis of serum glucose levels revealed that male rats of the groups CELH-Ir at doses of 100 and 400 mg/kg showed an increase when compared to the control group. Besides, male rats that were administered CELH-Ir at doses of 100 and 200 mg/kg showed a significant increase in the triglyceride dosage compared to the control group, as well as the female rats treated with 200 mg/kg CELH-NIr and 100 mg/kg CELH-Ir, exhibited the same increase compared to the control animals. The other biochemical parameters did not present any alteration.

Hematological analysis performed after 28 consecutive days of CELH administration (Table 8) shows that the groups of male rats treated with CELH-Ir had a significant increase in MCHC compared to the control and 100 mg/kg CELH-NIr groups. Female rats of the groups treated with CELH-Ir at doses 100 and 200 mg/kg showed a significant increase in MCHC dosage when compared to all groups treated with CELH-NIr.

The platelets and total leukocytes count of male rats in the 100 mg/kg CELH-NIr group showed a significant reduction compared to the control group. There is also a reduction in the MCV of erythrocytes of male rats of the groups 200 mg/kg CELH-NIr and 400 mg/kg CELH-Ir relative to the group 100 mg/kg CELH-NIr. Female rats did not show changes.

No difference was detected in  $\delta$ -ALA-D enzyme activity among the animals submitted to the different treatments (data not shown).



Table 5- Effect of repeated doses (28-day) of CELH on body weight of rats

Parameters	Group						
	Control	100 mg/kg CELH- NIr	200 mg/kg CELH- NIr	400 mg/kg CELH- NIr	100 mg/kg CELH-Ir	200 mg/kg CELH-Ir	400 mg/kg CELH-Ir
<b>Males</b>							
Initial weight (g)	182.20 ± 16.59	187.20 ± 13.61	187.60 ± 11.72	191.00 ± 11.79	183.80 ± 14.13	205.80 ± 6.34	187.80 ± 15.88
Final weight (g)	314.00 ± 24.15	313.20 ± 35.59	313.40 ± 21.87	335.00 ± 13.56	295.20 ± 19.20	340.20 ± 18.54	331.60 ± 36.49
Body weight gain (g)	131.80 ± 13.22	126.00 ± 23.56	125.80 ± 13.63	144.00 ± 4.74	111.40 ± 18.82	134.40 ± 13.79	143.80 ± 21.67
Body weight gain (%)	41.99 ± 2.67	40.00 ± 3.03	40.09 ± 2.18	43.02 ± 1.64	37.63 ± 4.77	39.43 ± 2.07	43.36 ± 1.93
Food intake (g/day)	26.83 ± 1.76	26.20 ± 1.18	25.94 ± 1.40	27.54 ± 2.01	25.00 ± 1.38	27.52 ± 1.72	27.93 ± 1.24
<b>Females</b>							
Initial weight (g)	128.20 ± 8.27	136.20 ± 10.26	134.40 ± 11.10	132.80 ± 7.33	141.60 ± 7.44	143.00 ± 6.44	135.60 ± 8.02
Final weight (g)	195.20 ± 11.78	203.40 ± 10.83	208.40 ± 4.04	200.80 ± 13.46	202.60 ± 6.54	210.00 ± 6.67	205.80 ± 12.85
Body weight gain (g)	67.20 ± 10.33	67.20 ± 6.06	74.00 ± 9.97	68.00 ± 11.20	61.00 ± 7.11	67.00 ± 6.52	70.20 ± 9.15
Body weight gain (%)	34.33 ± 3.97	33.06 ± 2.88	35.53 ± 4.84	33.73 ± 3.98	30.10 ± 3.23	31.89 ± 2.72	34.04 ± 3.15
Food intake (g/day)	16.59 ± 1.15	17.67 ± 1.18	18.06 ± 1.50	16.64 ± 2.00	17.52 ± 1.36	17.91 ± 1.93	17.87 ± 1.79

Results are presented as mean ± S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=5). No significant differences were observed.

Table 6- Relative organ weight (g/100 g of body weight) of rats treated orally during 28 days with CELH irradiated and non-irradiated

	Group						
	Control	100 mg/kg CELH-NIr	200 mg/kg CELH-NIr	400 mg/kg CELH-NIr	100 mg/kg CELH-Ir	200 mg/kg CELH-Ir	400 mg/kg CELH-Ir
<b>Males</b>							
Liver	4.04 ± 0.43	3.79 ± 0.31	3.69 ± 0.13	3.98 ± 0.21	4.16 ± 0.16	3.83 ± 0.34	4.14 ± 0.25
Kidney	0.81 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.81 ± 0.05	0.83 ± 0.04	0.86 ± 0.02	0.80 ± 0.02	0.85 ± 0.06
Heart	0.42 ± 0.03	0.47 ± 0.08	0.45 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.49 ± 0.05	0.43 ± 0.06	0.43 ± 0.04
Spleen	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.03
<b>Females</b>							
Liver	4.53 ± 0.20	4.60 ± 0.38	4.58 ± 0.34	4.94 ± 0.17	4.87 ± 0.43	4.96 ± 0.30	4.43 ± 0.23
Kidney	0.87 ± 0.06	0.82 ± 0.03	0.90 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.82 ± 0.03	0.86 ± 0.05	0.81 ± 0.02
Heart	0.50 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.47 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.48 ± 0.07	0.46 ± 0.07	0.52 ± 0.07
Spleen	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.28 ± 0.02

Results are presented as mean ± S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=5). No significant differences were observed.

Table 7- Biochemical parameters of rats submitted to a 28-day oral treatment with CELH non-irradiated and irradiated

Parameters	Group						
	Control	100 mg/kg CELH- NIr	200 mg/kg CELH- NIr	400 mg/kg CELH- NIr	100 mg/kg CELH-Ir	200 mg/kg CELH-Ir	400 mg/kg CELH-Ir
<b>Males</b>							
ALT (U/L)	63.20 ± 6.83	61.52 ± 8.79	53.80 ± 7.23	58.40 ± 7.26	52.20 ± 5.76	45.60 ± 2.96 <sup>a</sup>	48.50 ± 6.14

Parameters	Group						
	Control	100 mg/kg CELH-NIr	200 mg/kg CELH-NIr	400 mg/kg CELH-NIr	100 mg/kg CELH-Ir	200 mg/kg CELH-Ir	400 mg/kg CELH-Ir
<b>Males</b>							
AST (U/L)	102.90 ± 7.61	107.30 ± 6.48	114.50 ± 6.12	105.00 ± 8.51	105.10 ± 7.65	100.40 ± 6.98	83.78 ± 5.29 <sup>b</sup>
TP (mg/dL)	5.70 ± 0.28	5.60 ± 0.35	6.14 ± 0.62	5.56 ± 0.45	6.72 ± 0.60 <sup>c,e</sup>	6.86 ± 0.57 <sup>c,e</sup>	6.08 ± 0.62
BUN (mg/dL)	54.14 ± 8.73	52.38 ± 6.54	48.52 ± 5.56	51.18 ± 5.42	54.62 ± 7.03	50.76 ± 5.78	49.84 ± 7.24
CRE (mg/dL)	0.54 ± 0.05	0.54 ± 0.05	0.54 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.58 ± 0.11	0.60 ± 0.07	0.56 ± 0.05
GLU (mg/dL)	161.50 ± 29.05	175.30 ± 21.80	192.10 ± 35.30	189.00 ± 20.29	265.10 ± 41.49 <sup>a</sup>	196.00 ± 19.65	238.10 ± 14.53 <sup>a</sup>
TRIG (mg/dL)	57.60 ± 6.98	108.60 ± 18.20	100.20 ± 18.46	93.60 ± 9.91	118.60 ± 23.99 <sup>a</sup>	146.20 ± 15.12 <sup>a</sup>	82.40 ± 14.66
CHOL (mg/dL)	66.20 ± 6.26	59.40 ± 5.13	57.60 ± 2.07	54.80 ± 4.09	64.80 ± 5.45	61.00 ± 7.84	60.20 ± 8.29
<b>Females</b>							
ALT (U/L)	40.00 ± 5.70	40.40 ± 6.35	41.80 ± 5.07	43.40 ± 3.36	48.00 ± 5.43	36.40 ± 4.61	36.20 ± 5.63
AST (U/L)	73.44 ± 9.23	78.30 ± 10.80	68.78 ± 7.03	74.38 ± 10.82	78.10 ± 12.63	81.30 ± 6.26	78.38 ± 11.22
TP (mg/dL)	5.64 ± 0.53	5.46 ± 0.29	5.70 ± 0.45	5.64 ± 0.36	5.80 ± 0.34	5.94 ± 0.45	5.46 ± 0.21
BUN (mg/dL)	49.82 ± 5.26	46.28 ± 5.50	54.38 ± 3.79	51.42 ± 3.86	54.74 ± 5.93	50.88 ± 3.29	52.18 ± 3.48
CRE (mg/dL)	0.82 ± 0.08	0.74 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.82 ± 0.08	0.76 ± 0.09	0.76 ± 0.11	0.82 ± 0.11
GLU (mg/dL)	179.60 ± 27.69	177.20 ± 32.83	162.40 ± 30.03	201.60 ± 20.77	184.70 ± 25.30	231.10 ± 26.88	217.20 ± 37.72
TRIG (mg/dL)	56.40 ± 12.07	67.20 ± 12.01	102.00 ± 14.56 <sup>a</sup>	97.00 ± 22.48	105.20 ± 29.99 <sup>a</sup>	95.40 ± 14.24	88.20 ± 10.01
CHOL (mg/dL)	71.80 ± 12.95	80.80 ± 14.17	70.00 ± 11.34	68.20 ± 7.85	91.20 ± 10.03	84.00 ± 15.84	75.80 ± 14.25

Results are presented as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=5). Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), glucose (GLU), triglycerides (TRIG) and total cholesterol (CHOL). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . (a) Different from the control control group. (b) Different from other groups. (c) Different from the 100 mg/kg CELH-NIr group. (e) Different from the 400 mg/kg CELH-NIr group.

Table 8- Hematological parameters of rats submitted to a 28-day oral treatment with CELH non-irradiated and irradiated

Parameters	Group						
	Control	100 mg/kg CELH-NIr	200 mg/kg CELH-NIr	400 mg/kg CELH-NIr	100 mg/kg CELH-Ir	200 mg/kg CELH-Ir	400 mg/kg CELH-Ir
<b>Males</b>							
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	9.11 $\pm$ 0.37	8.48 $\pm$ 0.63	8.78 $\pm$ 0.14	8.45 $\pm$ 0.19	8.74 $\pm$ 0.59	8.85 $\pm$ 0.42	8.72 $\pm$ 0.19
HGB (g/dL)	15.62 $\pm$ 0.59	15.14 $\pm$ 1.13	14.86 $\pm$ 0.29	14.82 $\pm$ 0.45	15.38 $\pm$ 0.92	15.50 $\pm$ 0.77	15.04 $\pm$ 0.27
HCT (%)	51.04 $\pm$ 2.04	49.36 $\pm$ 4.42	47.02 $\pm$ 1.25	47.32 $\pm$ 1.35	47.50 $\pm$ 2.09	48.56 $\pm$ 2.46	46.86 $\pm$ 1.03
MCV (fL)	56.12 $\pm$ 2.68	58.22 $\pm$ 1.52	53.62 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	56.06 $\pm$ 1.78	54.46 $\pm$ 1.63	54.92 $\pm$ 0.68	53.78 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>
MCHC (g/dL)	30.54 $\pm$ 0.60	30.66 $\pm$ 0.75	31.50 $\pm$ 0.39	31.28 $\pm$ 0.39	32.32 $\pm$ 0.86 <sup>a,c</sup>	31.86 $\pm$ 0.41 <sup>a,c</sup>	32.04 $\pm$ 0.58 <sup>a,c</sup>
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1041.00 $\pm$ 49.64	749.20 $\pm$ 188.60 <sup>a</sup>	892.40 $\pm$ 149.40	821.00 $\pm$ 121.40	962.00 $\pm$ 84.41	902.80 $\pm$ 93.77	920.60 $\pm$ 28.86
PP (mg/dL)	6.74 $\pm$ 0.26	6.48 $\pm$ 0.23	6.32 $\pm$ 0.23	6.22 $\pm$ 0.31	6.84 $\pm$ 0.55	6.48 $\pm$ 0.36	6.40 $\pm$ 0.28
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	10.25 $\pm$ 1.82	6.77 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	8.54 $\pm$ 1.82	7.32 $\pm$ 0.97	9.04 $\pm$ 1.24	7.37 $\pm$ 2.26	8.12 $\pm$ 1.20
Neutrophils (%)	19.20 $\pm$ 5.71	28.00 $\pm$ 7.87	23.00 $\pm$ 7.07	19.40 $\pm$ 7.60	22.60 $\pm$ 4.23	16.60 $\pm$ 6.27	22.60 $\pm$ 7.89
Lymphocytes (%)	78.80 $\pm$ 5.54	69.40 $\pm$ 8.38	74.40 $\pm$ 7.05	78.60 $\pm$ 8.20	75.20 $\pm$ 5.16	81.00 $\pm$ 6.59	74.80 $\pm$ 7.46
Monocytes (%)	1.00 $\pm$ 0.71	1.40 $\pm$ 0.54	0.60 $\pm$ 0.54	1.20 $\pm$ 0.44	1.00 $\pm$ 1.00	1.20 $\pm$ 0.83	1.00 $\pm$ 0.70
Eosinophils (%)	1.00 $\pm$ 0.70	1.40 $\pm$ 0.54	2.00 $\pm$ 0.70	0.60 $\pm$ 0.54	1.20 $\pm$ 0.83	1.20 $\pm$ 0.83	1.60 $\pm$ 0.54

Parameters	Group						
	Control	100 mg/kg CELH- NIr	200 mg/kg CELH- NIr	400 mg/kg CELH- NIr	100 mg/kg CELH-Ir	200 mg/kg CELH-Ir	400 mg/kg CELH-Ir
Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>Females</b>							
RBC (x10 <sup>6</sup> /μL)	8.76 ± 0.41	8.33 ± 0.41	7.92 ± 0.61	8.33 ± 0.50	9.06 ± 0.61	8.62 ± 0.19	8.23 ± 0.16
HGB (g/dL)	14.58 ± 0.94	13.90 ± 0.82	13.42 ± 0.92	13.48 ± 1.19	15.12 ± 0.88	14.86 ± 0.63	14.22 ± 0.41
HCT (%)	49.56 ± 2.30	47.68 ± 2.89	46.02 ± 3.42	46.38 ± 4.08	49.32 ± 2.62	48.74 ± 1.97	47.78 ± 0.74
MCV (fL)	56.62 ± 1.18	57.32 ± 1.20	58.16 ± 1.29	55.68 ± 2.37	56.00 ± 2.07	56.56 ± 1.17	58.10 ± 1.14
MCHC (g/dL)	29.36 ± 0.58	29.10 ± 0.35	29.12 ± 0.50	29.04 ± 0.61	30.62 ± 0.97 <sup>c,d,e</sup>	30.46 ± 0.89 <sup>c,d,e</sup>	29.70 ± 0.56
PLT (x10 <sup>3</sup> /μL)	1181.00 ± 83.70	1104.00 ± 131.50	1189.00 ± 191.70	1046.00 ± 114.30	1226.00 ± 143.80	1183.00 ± 72.86	1243.00 ± 51.47
PP (mg/dL)	6.96 ± 0.21	6.68 ± 0.30	6.36 ± 0.38	6.68 ± 0.33	6.76 ± 0.26	6.96 ± 0.16	6.48 ± 0.23
WBC (x10 <sup>3</sup> /μL)	8.96 ± 1.29	9.68 ± 1.54	9.32 ± 2.81	8.85 ± 0.62	9.58 ± 1.21	9.28 ± 1.49	7.08 ± 0.74
Neutrophils (%)	20.00 ± 2.55	19.60 ± 4.77	22.60 ± 3.43	18.40 ± 5.03	18.40 ± 1.52	18.40 ± 1.82	18.80 ± 6.68
Lymphocytes (%)	75.40 ± 2.79	76.80 ± 4.86	74.20 ± 2.38	76.20 ± 4.49	77.00 ± 2.45	78.60 ± 1.52	76.80 ± 6.61
Monocytes (%)	1.90 ± 0.87	1.20 ± 0.45	1.40 ± 0.55	2.60 ± 1.14	3.00 ± 0.71	1.80 ± 0.83	2.00 ± 1.00
Eosinophils (%)	1.80 ± 1.09	2.00 ± 0.71	2.00 ± 0.71	2.60 ± 0.55	1.60 ± 0.55	1.20 ± 0.84	2.40 ± 1.14
Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.45	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.45	0.00 ± 0.00

Results are presented as mean ± S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n=5). Red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT), plasma protein (PP) and total leukocytes (WBC). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . (a) Different from the control

group. (c) Different from the 100 mg/kg CELH-NIr group. (d) Different from the 200 mg/kg CELH-NIr group. (e) Different from the 400 mg/kg CELH-NIr group.

#### 4 Discussion

Natural products have been used since antiquity as a cheap, efficient and apparently safe therapeutic option, however, their use may trigger serious adverse effects (Brondani *et al.*, 2017). In this study, the acute and subacute toxicity of the crude extract of the *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. leaves was evaluated, aiming to verify the safety of this widely used medicinal plant, as well as evaluating the effects of gamma radiation on the extract of this plant. The maslinic acid, which was detected in the CELH by HPLC-UV, is a pentacyclic triterpene that has anti-diabetic (Liu *et al.*, 2007), anti-inflammatory (Martin *et al.*, 2006), antiproliferative and antitumor properties (Juan *et al.*, 2008), which are in agreement with therapeutic activities already described for the leaves of the hibiscus (Arullappan *et al.*, 2013; Kandhare *et al.*, 2012; Sachdewa *et al.*, 2001). Zaki *et al.* (2017) identified two compounds in the extract of the leaves of the hibiscus, being the orientin (luteolin-8-C-glucoside) from the ethyl acetate fraction and the verbascoside in the butanolic fraction.

Free radicals and other reactive species are related to more than 150 human pathologies, such as rheumatoid arthritis, hemorrhagic shock and intestinal ischemia (Halliwell and Gutteridge, 2007). Therefore, the study of the antioxidant activity of a natural compound is important since it shows its ability to sequester free radicals and, consequently, its potential to be used in the treatment of diseases with pathogenesis related to oxidative stress (Paula *et al.*, 2014). When assessing the antioxidant capacity of CELH-NIr and CELH-Ir, the high activity of both was observed, as described by Garg *et al.*, 2012, who verified a significant activity of elimination of DPPH caused by the aqueous extract of the leaves of *H. rosa -sinensis*. Studies have also demonstrated the antioxidant capacity of this plant *in vitro* (Aziz *et al.*, 2015) and *in vivo* (Kandhare *et al.*, 2012; Zaki *et al.*, 2017).

The irradiated extract had higher antioxidant activity than the non-irradiated one, represented by the lower value of IC<sub>50</sub>, a phenomenon also observed in another study that evaluated the effect of gamma radiation on natural products (Pereira *et al.*, 2015). However, Pereira *et al.* (2016b) evaluated the effect of radiation on *Arenaria montana* L. and verified that the gamma radiation at the dose of 10 kGy considerably reduces its antioxidant activity, being the main parameter affected by the radiation at this dosage. This data serves as a guideline in the choice of dose, given the importance of maintaining the bioactive profile of the plant.

The presence of secondary metabolites in the plant is related to its antioxidant property (Kandhare *et al.*, 2012). Total polyphenols and flavonoids, which have shown to have an accentuated concentration in both CELH-NIr and CELH-Ir, have this property by acting as stable intermediate radicals, preventing the oxidation of other compounds, and by their ability to donate hydrogen or electrons to unstable compounds, stabilizing them (Silva *et al.*, 2010). The flavonoids present in the hibiscus leaves are also related to other properties presented by the extract, such as the anthelmintic activity described by Nath and Yadav (2016). A preliminary phytochemical screening showed the presence of flavonoids, terpenoids and phenols in the aqueous extract of hibiscus leaves, while the presence of alkaloids, tannins, coumarins, glycosides and quinones was not detected (Gupta *et al.*, 2009).

The fact that the concentrations of phenolic compounds and flavonoids have decreased, and even though the antioxidant activity was higher in the irradiated extract, is justified because the gamma radiation can interact with the biomolecules of the plant, reducing the synthesis of the compounds, immobilizing or causing its degradation, with consequent decrease in its levels. However, it can lead to the increase of the dosage of other substances (Ahuja *et al.*, 2014). Doses of 0.5 to 10 kGy of gamma radiation may or may not cause changes in the concentration of plant constituents due to physico-chemical changes in plant material, being these variations characteristic of each species (Santos *et al.*, 2013). Some factors that can influence are the water content in the irradiated product, temperature and oxygen present during the process (Tezotto-Uliana *et al.*, 2015) and the dosage of the present compounds, as seen by Santos *et al.* (2013), that at higher concentrations of tannins, the radiation has less interference in the product. Moreover, the antioxidant defenses of a plant are not restricted to a single compound, but to several, which act synergistically and can undergo the influence of different processes, such as heat treatment (boiling and microwaves), potentiating the antioxidant capacity (Ravichandran *et al.*, 2013).

The evaluation of biochemical and hematological parameters is fundamental in study of the safety of a compound, since alterations may be related to damages to the organism of the animals that possibly are also affect humans (Wang *et al.*, 2014). Through the acute toxicity study, a single dose of CELH-NIr or CELH-Ir did not cause changes in the hematological and biochemical indices that showed clinical significance, with the observed differences being related to physiological variability, and the parameters maintained within the ranges considered normal for the species (Lima *et al.*, 2014). In addition, no signs of toxicity, such as behavioral changes, weight gain and mortality, were observed in animals at any moment in the study. According to OECD guideline 423, the results found in the present

study allow the classification of the CELH, both non-irradiated and irradiated, into risk category 5, which estimates an LD<sub>50</sub> between 2000 and 5000 mg/kg for the test substance. Corroborating with this data, in the study by Zaki *et al.* (2017), the administration of methanolic extract of the leaves of *H. rosa-sinensis* up to the dose of 3000 mg/kg did not cause mortality in rats. Therefore, CELH-NIr and CELH-Ir, when administered orally as single dose or multiple doses within 24 hours, are considered to be of relatively low toxicity (OECD, 2001).

The liver plays a number of functions vital to organism, such as the synthesis of plasma proteins and coagulation factors, and the metabolism of endogenous and exogenous substances, such as drugs and alcohol. By playing this role of clearance of chemicals, the liver is highly susceptible to toxic damage. The increased activity of ALT and AST enzymes are important markers of toxic liver injury (Singh *et al.*, 2011). In our study, a reduction in ALT and AST activities in the groups of males rats treated with CELH-Ir (200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively) was observed. The total protein dosage is an indicator of hepatic function, since the reduction in its levels is related to the decrease in the synthetic capacity of the organ (Singh *et al.*, 2011). In this work, an increase was observed in total serum protein dosage of male animals treated with CELH-Ir (100 and 200 mg/kg). These results are very important to evaluate the safety associated with the use of CELH, assessing the possible absence of hepatotoxicity of the extract is verified.

The kidney is the main organ involved in the excretion of substances, therefore, it is an important target for toxicity. Blood levels of BUN and creatinine reflect renal function (Raina *et al.*, 2015) and were not altered after repeated doses of CELH-NIr and CELH-Ir, indicating that they do not cause nephrotoxicity.

Some studies demonstrate the hypoglycemic and hypolipidemic activity of aerial parts and hibiscus root (Kumar *et al.*, 2009; Mandade and Sreenivas, 2011), which were not verified in our study. Increased glycemia in the CELH-Ir treated animals, although not significant in male rats treated with CELH-Ir at the dose of 200 mg/kg nor in female rats, suggests that the radiation may have caused the synthesis of a constituent associated with hyperglycemia. In addition, CELH was responsible for a significant increase in triglyceride levels. This increase is not related to the dose of the extract, however, it may be associated with the stimulation of lipidic anabolism in the animal or, less probable, the presence of compounds with high fat content in the leaves of the hibiscus (Ntchapda *et al.*, 2014).

In a study with diabetic rats, Mandade and Sreenivas (2011) observed that the extract of the aerial parts of the hibiscus was able to reduce the glycemia to levels close to the



control, revealing an antihyperglycemic effect of the plant, being this reduction associated with the increase of pancreatic insulin secretion or the potentiation of glucose transport to peripheral tissues. Another study showed that the hibiscus root had hypolipidemic activity in rats with induced hyperlipidemia, possibly by reactivating lipolytic enzymes (Kumar *et al.*, 2009). These parameters were not evaluated in healthy rats and our study suggests that these activities are expressed only when there is an associated disease.

Since the reduction of body weight of animals, reduction in food intake and variation in the relative weight of the body organs are important signs of systemic toxicity (Cunha *et al.*, 2009) and none of these alterations were found in the present study, these indices corroborate with the idea that CELH administered for 28 days was well tolerated by the animals.

Hematological parameters are very sensitive to toxic products and are seen as essential indicators of the physiological or pathological state of animals and humans (Raina *et al.*, 2015). For the analysis of the hematological system it is necessary to correlate the indices and in this study in most of them there was no difference between the different groups, the observed variations do not follow a dose-dependent pattern nor are they common to both sexes; moreover, all dosages are within the range considered normal for the species (Lima *et al.*, 2014). Thus, the variations found have no clinical significance and supposed to be not reflective of any toxic effect.

## 5 Conclusion

In summary, the results demonstrate that the aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. leaves after single or repeated doses does not cause any hepatic or renal toxicity, nor does it have deleterious effects on the hematological system and does not present important systemic toxic effects. Thus, we conclude that CELH-NIr and CELH-Ir is safe when used in the conditions applied in this study, however, it is recommended that further studies be performed to evaluate its effect when used for longer periods and to clarify if the slight variations observed in this work are related to the plant. Although gamma radiation caused a decrease in the concentration of some of the extract constituents, it did not interfere in the absence of toxicity presented by hibiscus leaves. Since each species is influenced in a unique way by radiation in the concentration of compounds, it is suggested that each species be studied individually before selecting the method of decontamination and conservation. In

addition, the radiation increased the antioxidant activity of the extract, and could be useful to potentiate other therapeutic properties of the hibiscus.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of CAPES/Brazil and Bioclin/Quibasa for the donation of commercial kits.

### References

- Ahuja, S., Kumar, M., Kumar, P., Gupta, V.K., Singhal, R.K., Yadav, A., Singh, B., 2014. Metabolic and biochemical changes caused by gamma irradiation in plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 300(1), 199–212, <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-014-2969-5>
- Arullappan, S., Muhamad, S., Zakaria, Z., 2013 Cytotoxic Activity of the Leaf and Stem Extracts of *Hibiscus rosa sinensis* (Malvaceae) against Leukaemic Cell Line (K-562). *Trop. J. Pharm. Res.* 12(5), 743–746, <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i5.12>
- Ateba, S.B., Simo, R.V., Mbanya, J.C., Krenn, L., Njamen, D., 2014. Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae) in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in *Wistar* rats. *Food Chem. Toxicol.* 65, 27–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.016>
- Aziz, S., Konwar, M., Das, S., 2015. In-vitro anticataract activity of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn on goat lens. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7(5), 5–7.
- Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de atenção Básica. 2015. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. Second ed. Brasília, Distrito Federal. 96 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. 2016. Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília, Distrito Federal. 190 p.
- Brondani, J.C., Reginato, F.Z., Brum, E.S., Vencato, M.S., Lhamas, C.L., Silva, C.V., Rocha, M.I.U.M., Bauermann, L.F., Manfron, M.P., 2017. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. *J. Ethnopharmacol.* 202, 147–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.011>
- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Ag. Food Chem.* 52, 3583–3589, <https://doi.org/10.1021/jf0352632>
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S, Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal

plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161–1168, [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00332-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00332-1)

Cunha, L.C., Azeredo, F.S., Mendonça, A.C.V., Vieira, M.S., Pucci, L.L., Valadares, M.C., Freitas, H.O.G., Sena, A.A.S., Lino Junior, R.S., 2009. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19(2A), 403–411, <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300012>

Garg, D., Shaikh, A., Muley, A., Marar, T., 2012. In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. *Free Rad. Antiox.* 2(3):41-46. <http://doi.org/10.5530/ax.2012.3.6>

Goldberg, K. H., Yin, A. C., Mupparapu, A., Retzbach, E. P., Goldberg, G. S., Yang, C. F., 2017. Components in aqueous *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract inhibit in vitro melanoma cell growth. *J. Tradit. and Complement. Med.* 7(1), 45–49. <http://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.01.005>.

Gupta, V., Bansal, P., Garg, A., Meena, A. K., 2009. Pharmacopoeial Standardization of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. *IJPCR* 1(3), 124–126.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4nd ed. New York: Oxford University Press.

Jadhav, V.M., Thorat, R.M., Kadam, V.J., Sathe, N.S., 2009. Traditional medicinal uses of *Hibiscus rosa-sinensis*. *J. Pharm. Res.* 2(8), 1220–1222.

Juan, M.E., Planas, J.M., Ruiz-Gutierrez, V., Daniel, H., Wenzel, U., 2008. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br. J. Nutr.* 100, 36–43, <http://doi.org/10.1017/S0007114508882979>

Kandhare, A.D., Raygude, K.S., Ghosh, P., Ghule, A.E., Gosavi, T.P., Badole, S.L., Bodhankar, S.L., 2012. Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. leaves in experimental colitis in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2(5), 337–344, [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60053-7](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60053-7)

Kumar, A., Singh, V., 2012. Review on *Hibiscus rosa sinensis*. *Int. J. Pharm. Biomed. Res.* 3(2), 534–538.

Kumar, V., Singh, P., Chander, R., Mahdi, F., Singh, S., Singh, R., Khanna, A. K., Saxena, J.K., Mahdi, A. A., Singh, V. K., 2009. Hypolipidemic activity of *Hibiscus rosa sinensis* root in rats. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 46(6), 507–510.

Lima, C.M., Lima, A.K., Melo, M.G.D., Dória, G.A.A., Leite, B.L.S., Serafini, M.R., Albuquerque-Junior, R.L.C., Araujo, A.A.S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 10(3), 1–9.

- Liu, J., Sun, H., Duan, W., Mu, D. Zhang, L., 2007. Maslinic Acid Reduces Blood Glucose in KK-Ay Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 30(11), 2075–2078, <http://doi.org/10.1248/bpb.30.2075>
- Mandade, R., Sreenivas, S.A., 2011. Anti-Diabetic Effects of Aqueous Ethanolic Extract of *Hibiscus rosasinensis* L. on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats and the Possible Morphologic Changes in the Liver and Kidney. *Int. J. Pharmacol.* 7, 363–369, <http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2011.363.369>
- Martin, A.M., Vázquez, R.P., Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V., 2006. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radical Res.* 40(3), 295–302, <http://dx.doi.org/10.1080/10715760500467935>
- Nath, P., Yadav, A.K., 2016. Anticestodal properties of *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae): an *in vitro* and *in vivo* study against *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819), a zoonotic tapeworm. *J. Parasit. Dis.* 40(4), 1261–1265, <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-015-0664-2>
- Ntchapda, F., Abakar, D., Kom, B., Nana, P., Hamadjida, A., Dimo, T., 2014. Acute and sub-chronic oral toxicity assessment of the aqueous extract leaves of *Ficus glumosa* Del. (Moraceae) in rodents. 3(4), 206–213, <http://dx.doi.org/10.5455/jice.20140913021547>
- Organization for economic cooperation and development (OECD), 2001. Guideline 423. Acute oral toxicity - acute toxic class method. 470 adopted by the council on 17th, december 2001.
- Organization for economic cooperation and development (OECD), 2008. Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. Adopted in 1981, and revised method adopted 3rd October 2008.
- Paula, C.S., Cantareli, V.C.D., Verdam, M.C.S., Kalegari, M., Campos, R., Hirota, B.C.K., Miguel, O.G.M., Miguel, M.D., 2014. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 16(2), 189–95, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000200004>
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A., Bento, A., Ferreira, I. C. F. R., 2015. Analytical Methods Applied to Assess the Effects of Gamma Irradiation on Color , Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Ginkgo biloba* L. *Food Anal. Methods* 8(1), 154–163, <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-014-9883-x>
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A.L., Cabo Verde, S., Santos-buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2016a. Infusions from *Thymus vulgaris* L. treated at different gamma radiation doses : Effects on antioxidant activity and phenolic composition. *LWT - Food Sci. Technol.* 74, 34–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.027>
- Pereira, E., Barros, L., Barreira, J.C.M., Carvalho, A.M., 2016b. Electron beam and gamma irradiation as feasible conservation technologies for wild *Arenaria montana* L.: effects on chemical and antioxidant parameters. Running Title: Electron beam and gamma irradiation of

- Arenaria montana*. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 36, 269–276, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.012>
- Raina, P., Chandrasekaran, C.V., Deepak, M., Aggarwal, A., Ruchika, K.-G., 2015. Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of *O. sanctum* in Wistar rats: Clinical, hematological, biochemical and histopathological studies, *J. Ethnopharmacol.* 175, 509–517, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.015>
- Ravichandran, K., Min, N., Thaw, M., Mohdaly, A.A.A., Gabr, A.M.M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I., 2013. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res. Int.* 50(2), 670–675, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.002>
- Rivas, C.A.B., Castillo, A.A., Martinez, H.S., Zapata, E.P., Hernandez, J.B., Tasse, Y.M., 2013. Acute oral toxicity of *Azadirachta indica* (Neem Tree). *Rev. Cubana Plant. Med.* 18(3), 502–507.
- Roberts, P.B., 2014. Food irradiation Is safe: Half A century of studies. *Radiat. Phys. Chem.* 105, 78–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2014.05.016>
- Sachdewa, A., Nigam, R., Khemani, L.D., 2001. Hypoglycemic effect of *Hibiscus rosa sinensis* L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 39(3), 284–286.
- Santos, G.H.F., Silva, E.B., Melo, A.M.M.A., Amorim, E.L.C., Peixoto Sobrinho, T.J.S., Lima, C.S.A., 2013. Influência da radiação gama na ação moluscicida de extratos de cajueiro em *Biomphalaria glabrata*. *Scientia Plena* 9(8), 081012.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28(2-3), 133–145.
- Schmidt, M. 2016. Distribuição de compostos triterpênicos por HPLC-UV em espécies de *Cecropia* e *Bauhinia*. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria, RS, 75 p.
- Silva, A.B., Wiest, J.M., Carvalho, H.H.C., 2016. Chemicals and antioxidant activity analysis in *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-venus) and *Hibiscus syriacus* L. (hibiscus-the-syrian). *Braz. J. Food Technol.* 19, e2015074, <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7415>
- Silva, M.L.C., Costa, R.S., Santana, A.S., Koblitz, M.G.B., 2010. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semin: Cien. Agrar.* 31 (3), 669–682, <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p669>
- Singh, A., Bhat, T.K., Sharma, O.P., 2011. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *J. Clinic. Toxicol.* S4:001, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.S4-001>
- Tezotto-Uliana, J.V., Silva, P.P.M., Kluge, R.A., Spoto, M.H.F., 2015. Radiação Gama em Produtos de Origem Vegetal. *Rev. Virtual Quim.* 7(1), 267–277, <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150013>

Wang, L., Li, Z., Li, L., Li, Y., Yu, M., Zhou, Y., Lv, X., Arai, H., Xu, Y., 2014. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Cortex Dictamni* in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 158, 207–215, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.027>

Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, 99–105, <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

Zaki, L.H., Mohamed, S.M., Bashandy, S.A.E., Morsy, F.A., Tawfik, K.M., Shahat, A. A., 2017. Hypoglycemic and antioxidant effects of *Hibiscus rosasinensis* L. leaves extract on liver and kidney damage in streptozotocin induced diabetic rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 11(13), 161–169, <http://dx.doi.org/10.5897/AJPP2017.4764>

### 3 CONCLUSÃO

- A quantificação de flavonoides e polifenóis totais permitiu detectar altas concentrações desses compostos no extrato bruto das folhas do hibisco, as quais foram reduzidas no extrato irradiado.
- Através da CLAE foi possível identificar e quantificar o composto ácido maslínico, que também teve a sua concentração diminuída pela ação da radiação.
- O CELH apresentou expressiva atividade antioxidante, a qual foi potencializada pela radiação gama, verificado pela diminuição na IC<sub>50</sub> do extrato irradiado.
- Com relação ao estudo da toxicidade oral aguda e subaguda, observamos que importantes marcadores de função hepática e renal não apresentaram variação em decorrência do tratamento com CELH; sendo assim, conclui-se que esse extrato não é hepato ou nefrotóxico. Além disso, não foram verificadas alterações comportamentais, bem como qualquer indício de toxicidade nos animais tratados com CELH, tanto quando administrada dose única do extrato como quando utilizadas doses repetidas. O CELH também não causou alteração nos valores de peso corporal, peso relativo dos órgãos e parâmetros hematológicos dos animais, indicando que o mesmo não é tóxico, sendo seguro quando utilizado nas condições empregadas nesse trabalho.
- A radiação gama não interferiu na ausência de toxicidade apresentada pelo extrato, porém causou a diminuição da concentração de alguns de seus constituintes. Ademais, a radiação aumentou a atividade antioxidante do CELH, podendo ser útil para potencializar outras propriedades terapêuticas do hibisco.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Mais estudos são necessários para avaliar o efeito das folhas de *H. rosa-sinensis* quando administradas por maiores períodos e esclarecer se pequenas variações em alguns parâmetros, como por exemplo o aumento nos níveis sorológicos de triglicerídeos e glicose observado nesse trabalho, estão relacionadas à planta.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, H. M.; ESMAT, A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the major phenolics from *Zygophyllum simplex* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALI KHAN, M. S.; NAZAN, S.; MAT JAIS, A. M. Flavonoids and anti-oxidant activity mediated gastroprotective action of Leathery Murdah, *Terminalia coriacea* (Roxb.) Wight & Arn. Leaf methanolic extract in rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2017. DOI: 10.1590/S0004-2803.201700000-21. [Epub ahead of print]
- ALI, R. F. M.; EL-ANANY, A. M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds oil in experimental male rats. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 1, p. 41-49, 2017.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para detecção de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMENYA, H. Z. *et al.* Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 593-599, 2014.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. **Diário Oficial da União**; Poder executivo, 29 jan. 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/Resolucao\\_RDC\\_n\\_21\\_de\\_26\\_de\\_janeiro\\_de\\_2001.pdf/28d81caa-e8ba-44a8-bcdc-83f950a29f35](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/Resolucao_RDC_n_21_de_26_de_janeiro_de_2001.pdf/28d81caa-e8ba-44a8-bcdc-83f950a29f35)>. Acesso em: 15 maio 2017.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". **Diário Oficial da União**; Poder executivo, 18 mar. 2004. Brasil, 2004. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/re\\_90\\_guia\\_tox.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/re_90_guia_tox.pdf)>. Acesso em 07 maio 2017.

ARULLAPPAN, S.; MUHAMAD, S.; ZAKARIA, Z. Cytotoxic Activity of the Leaf and Stem Extracts of *Hibiscus rosa sinensis* (Malvaceae) against Leukaemic Cell Line (K-562). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 743-746, 2013.

ATEBA, S. B. *et al.* Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae) in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 27–32, 2014.

AZIZ, S.; KONWAR, M.; DAS, S. In-vitro anticataract activity of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn on goat lens. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 5–7, 2015.

BELO HORIZONTE. **Manual de exames laboratoriais da rede SUS-BH**. Belo Horizonte, 2016.

BRASIL. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, 2006. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm)>. Acesso em 06 maio 17.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. 2016. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. p. 1-190.

BUBOLS, G. B. **Avaliação clínico-laboratorial dos possíveis efeitos deletérios dos polifenóis no terceiro trimestre de gestação**. 2013. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants , prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CASTRO, D. L. L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: um enfoque qualitativo no Distrito Federal**. 2006. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2006.

FERRUELO, A. *et al.* Los polifenoles del vino ejercen su efecto antineoplásico sobre la línea celular PC-3 andrógeno resistente a través de la inhibición de la actividad transcripcional del promotor de COX-2 mediada por NF-k. **Actas Urológicas Españolas**, v. 38, n. 7, p. 429-437, 2014.

GAD, S. B.; EL-SHERIF, A. G.; REFAEI, A. R. Reaction of certain malvaceae cultivars to *Meloidogyne incógnita* infection under greenhouse conditions. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 4, n. 3, p. 309-315, 2013.

GARG, D. *et al.* In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 41-46, 2012.



GRANATO, E. M. *et al.* Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 130-135, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4nd ed. New York: **Oxford University Press**, 2007.

JADHAV, V. M., *et al.* Traditional medicinal uses of *Hibiscus rosa-sinensis*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 8, p. 1220-1222, 2009.

KANDHARE, A. D. *et al.* Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. leaves in experimental colitis in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 5, p. 337-344, 2012.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

KUMAR, A.; SINGH, A. Review on *Hibiscus rosa sinensis*. **International journal of pharmaceutical and biomedical research**, v. 3, n. 2, p. 534-538, 2012.

NAJAFI, M. *et al.* Analysis of Gafchromic EBT3 film calibration irradiated with gamma rays from different systems: Gamma Knife and Cobalt-60 unit. **Medical Dosimetry**, 2017. Disponível em: < [http://www.meddos.org/article/S0958-3947\(17\)30013-4/pdf](http://www.meddos.org/article/S0958-3947(17)30013-4/pdf)>. Acesso em: 09 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.meddos.2017.01.003. [Epub ahead of print]

NANDI, D. M. **Estudo de funcionalidade e segurança para aceleradores lineares utilizados em radioterapia – uma contribuição para a gestão de tecnologia médico-hospitalar**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004.

NATH, P.; YADAV, A. K. Anticestodal properties of *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae): an *in vitro* and *in vivo* study against *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819), a zoonotic tapeworm. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 4, p. 1261-1265, 2016.

NEEGHEEN-BHUIJUN, V. S. Underestimating the Toxicological Challenges Associated with the Use of Herbal Medicinal Products in Developing Countries. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 804086, 9 pages, 2013.

NYAM, K. L. *et al.* Functional properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed and its application as bakery product. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3830-3838, 2014.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OMI, N. M. **Desenvolvimento de irradiador gama dedicado ao beneficiamento de pedras preciosas**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo – SP, 2006.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2001a. Guidance Document on Acute Oral Toxicity. **Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N° 24**. 24 p. Paris, June, 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2001b. Guideline 423. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. 470 Adopted by the Council on 17th, December, 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2008. Guideline 407. **Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. 407 Adopted in 1981, and revised method adopted 3rd Paris, October, 2008.

PEKAMWAR, S. S.; KALYANKAR, T. M.; JADHAV, A. C. *Hibiscus rosa-sinensis*: a review on ornamental plant. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 6, p. 4719-4727, 2013.

PEREIRA, E. *et al.* Analytical Methods Applied to Assess the Effects of Gamma Irradiation on Color, Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Ginkgo biloba* L. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 154-163, 2015.

PEREIRA, E. *et al.* Electron beam and gamma irradiation as feasible conservation technologies for wild *Arenaria montana* L.: Effects on chemical and antioxidant parameters. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 269–276, 2016.

PINO, E. S.; GIOVEDI, C. Radiação ionizante e suas aplicações na indústria. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 2, n. 2, 2005.

PORTAL BRASIL. Ministério da Saúde. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobre 161%. 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterpicos-sobe-161>>. Acesso em 06 maio 2017.

POSER, G. L. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 23-28, 2017.

RAHMAN, A. H. M. M.; GONDHA, R. Taxonomy and Traditional Medicine Practices on Malvaceae (Mallow Family) of Rajshahi, Bangladesh. **Open Journal of Botany**, v. 1, n. 2, p. 19-24, 2014.

RAMALINGAYYA, G. V. *et al.* Rutin protects against neuronal damage in vitro and ameliorates doxorubicin-induced memory deficits in vivo in Wistar rats. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1011-1026, 2017.

RODRIGUES, H.G. *et al.* Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.3, p.359-366, 2011.

RUBAN, P.; GAJALAKSHMI, K. In vitro antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 5, p. 399–403, 2012.

SACHDEWA, A.; NIGAM, R.; KHEMANI, L. D. Hypoglycemic effect of *Hibiscus rosa sinensis* L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 3, p. 284-286, 2001.

SAHU, C. R. Mechanisms involved in toxicity of liver Caused by Piroxicam in Mice and Protective effects of leaf extract of *Hibiscus rosa-sinensis* l. **Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v. 9, p. 9–13, 2016.

SANTOS, G. H. F. **Influência da radiação gama em extratos vegetais ricos em taninos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2008.

SHAKYA, P. *et al.* Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jphp.12743/abstract;jsessionid=C2FA0315913B310E79480F4E0F929863.f03t03>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1111/jphp.12743. [Epub ahead of print]

SILVA, A. B.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Compostos químicos e atividade antioxidante analisados em *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, e2015074, 2016.

SILVA, H. G. O. **Efeito da esterilização por irradiação gama na camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert]**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares – MG, 2011.

SILVA, N. A. S. e. **Caracterização e irradiação gama (60Co) de arroz de diferentes cultivares no controle de insetos-pragas de grãos armazenados e de fungos**. 2010. Dissertação (Mestre em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2010.


SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. 640 p. 2005.

VADIVEL, V.; SRIRAM, S.; BRINDHA, P. Distribution of flavonoids among Malvaceae family members – A review. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 10, n. 1, Suppl, 2016.

VOGEL, P. *et al.* Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 3, p. 1427-1433, 2015.

YANG, H. N. *et al.* Aloe-induced Toxic Hepatitis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, p. 492-495, 2010.

**ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**



**Gerência de Ensino e Pesquisa  
do Hospital Universitário de Santa Maria**

**FOLHA DE REGISTRO E ACOMPANHAMENTO DE PROJETOS**

Nº Inscrição GEP: 095 / 2015 Data: 22/12/2015

Pesquisador: Silvane de Freitas Bauermann Função: professora associada  
 SIAPE: 227178 Telefone: 320-9380 Unidade/Curso: Departamento de Radioterapia E-mail: lgbbauermann@ufsm.br  
 Título: Avaliação de perfil fitoquímico, atividade antioxidante e toxicidade do extrato bruto dos folhos de Hibiscus rosa-sinensis Linn. em células eucariotas com radiação gama  
 TIPO DE PROJETO:  Pesquisa  Extensão  Institucional  
 FINALIDADE ACADÊMICA:  TCC  Especialização  Dissertação  Tese  Iniciação Científica  Não Acadêmica  
 TIPO DE PESQUISA:  Inovações Tecnológicas em Saúde  Ciências Sociais e Humanas Aplicadas a Saúde  
 Ensaio Clínico:  Fase I  Fase II  Fase III  Fase IV  Epidemiológico  Infraestrutura  Avaliação de Tecnologia em Saúde  Biomédica (Stricto Sensu)  Clínica Epidemiológica Observacional  Pré-Clinica  Qualitativa  Sistema de Saúde Planejamento e Gestão de Políticas; Programa e Serviços da Saúde  Outras Ações de C & T  
 FONTE DE FINANCIAMENTO:  Recursos do Pesquisador  HUSM  Agência Pública de fomento nacional (Capes, Cnpq, Fapergs, etc)  Agência Pública de fomento internacional  Indústria Farmacêutica  Edital Interno UFSM  
 GRUPO DE PESQUISA:  
 Não  Sim, Qual: Implicações dos Radicais Livres em Patologia  
 OBS: A fonte de financiamento da pesquisa deverá estar claramente definida no projeto. Caso haja custos para o HUSM a forma de ressarcimento deverá estar definida no projeto e com o setor envolvido.

Silvane de Freitas Bauermann  
Pesquisador Responsável

**Avaliação e Aprovação Setorial**

**Atenção Chefia: favor ler o projeto e avaliar as condições de realização no Setor antes de assinar.**

Setores envolvidos	Concorda com o projeto	Assinatura e carimbo dos responsáveis
<u>Silvane de Freitas Bauermann</u>	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<u>Silvane de Freitas Bauermann</u> CRB: 17045 - 03D MEC: LP 02218/89 UFSM - MAT 2227178
<u>JOSÉ CARLOS R. SILVA</u>	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<u>José Carlos da Rosa Gama</u> Chefe do Setor SIAPE: 381871 Radioterapia - UFSM/UFSM
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	

PARECER COMISSÃO CIENTÍFICA GEP: De acordo Data: 29.02.16

PARECER: De acordo

FINAL/GEPI: As Comités de Ética e Bem-Estar Animal de UFSM  
 Prof.ª Beatriz Silvana da Silveira Porto  
 Gerente de Ensino e Pesquisa  
 HUSM - EBSERH  
 SIAPE 1146155

Beatriz S. Porto  
 Assinatura e Carimbo  
 Data: 26/02/16

## ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do perfil fitoquímico, atividade antioxidante e toxicidade do extrato bruto das folhas de *Hibiscus rosasinensis* Linn, não irradiado e irradiado com radiação gama", protocolado sob o CEUA nº 5306210116, sob a responsabilidade de **Liliane de Freitas Bauermann e equipe**; *Andreia Regina Haas da Silva*; *Camille Gaube Guex*; *Fernanda Ziegler Reginato*; *Gilberti Helena Hübscher Lopes*; *Kássia Caroline Figueredo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em reunião de 31/03/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of the phytochemistry profile, antioxidant activity and toxicity of the crude extract of the leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn, non-irradiated and irradiated with gamma radiation", utilizing BB Heterogenics rats (males or females), protocol number CEUA 5306210116, under the responsibility of **Liliane de Freitas Bauermann and team**; *Andreia Regina Haas da Silva*; *Camille Gaube Guex*; *Fernanda Ziegler Reginato*; *Gilberti Helena Hübscher Lopes*; *Kássia Caroline Figueredo* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 03/31/2016.

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 08/2016

Área: Fisiologia E Farmacologia

Procedência: Biotério Central UFSM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos ou Fêmeas

idade: 6 a 6 semanas

N: 88

Linhagem: Wistar

Peso: 150 a 200 g

Resumo: *Hibiscus rosa-sinensis* L., pertencente à família Malvaceae, conhecido como hibisco, mimo-de-vênus, rosa da china e pampola, tem suas folhas empregadas popularmente como laxante e para o tratamento de alopecia, hipertensão, doenças de pele, perda de peso, etc. Ademais, alguns estudos atribuem-lhe propriedades antifúngica, antibacteriana, analgésica, antidiabética e protetora gástrica. Assim como acontece com o *Hibiscus rosa-sinensis*, uma infinidade de outras plantas são empregadas no tratamento de doenças, porém, para isso é imprescindível que não apresentem toxicidade nem contaminantes. Radiação ionizante é uma promissora opção para a descontaminação e conservação de plantas, sendo a radiação gama de <sup>60</sup>Co considerada a mais eficiente para esse fim. Tendo em vista a grande utilização das folhas de *Hibiscus rosasinensis* para o combate de patologias e que inexistem estudos que avaliem a sua toxicidade, objetiva-se nesse trabalho avaliar a toxicidade aguda e subaguda in vivo do extrato bruto das folhas de *Hibiscus rosa-sinensis*, da forma como preconiza os Gulas da OECD 423 e 407, respectivamente, além de quantificar os metabólitos secundários e a atividade antioxidante desse extrato. Pretende-se também verificar se a radiação ionizante, método potencial para conservação de plantas medicinais, gera alteração nos níveis de constituintes, atividade ou toxicidade dessa planta. Para isso, parte do extrato bruto será irradiado com radiação gama de <sup>60</sup>Co nas doses de 5 e 10 kGy, e os experimentos feitos com o extrato bruto não irradiado serão realizados igualmente com o extrato bruto irradiado.

Santa Maria, 01 de abril de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Roseberg  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

**ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA  
JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY**

● **Journal of Ethnopharmacology** <EvisSupport@elsevier.com>

Hoje em 16:26 ★

Para fernanda\_zr@yahoo.com.br

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: JEP\_2017\_2327

Title: SAFETY EVALUATION (ACUTE AND SUBACUTE STUDIES) OF NON-IRRADIATED AND IRRADIATED CRUDE EXTRACT OF Hibiscus rosa-sinensis Linn. LEAVES IN WISTAR RATS

Journal: Journal of Ethnopharmacology

Dear Miss. Ziegler Reginato,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Ethnopharmacology. Your submission was received in good order.

What happens next: Your paper will undergo a screening process by the managing editors of the journal. During this stage the manuscript is rigorously checked for alignment with aims and scope of the journal, plagiarism, checking the completeness of the general submission, adherence to authors guidelines etc. Due to the high influx of papers, please allow 2-3 weeks for this process to be completed. Once the pre-screen is completed the paper will either be returned to you or be assigned to an Associate Editor.

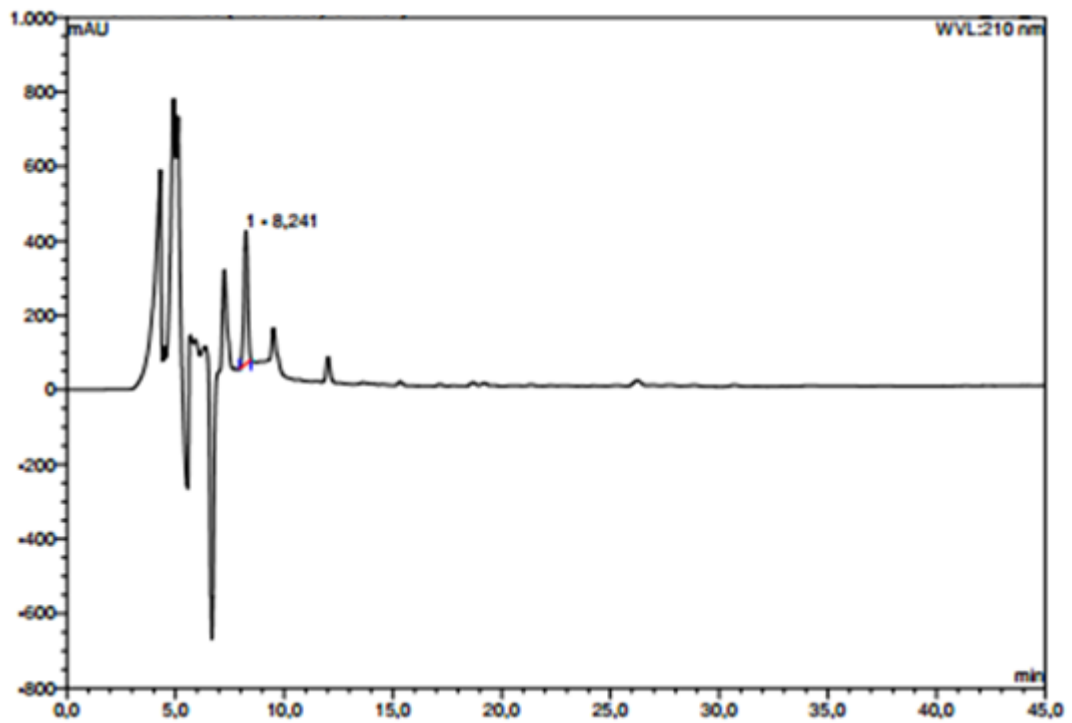
To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL\\_ACR=JEP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=JEP) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

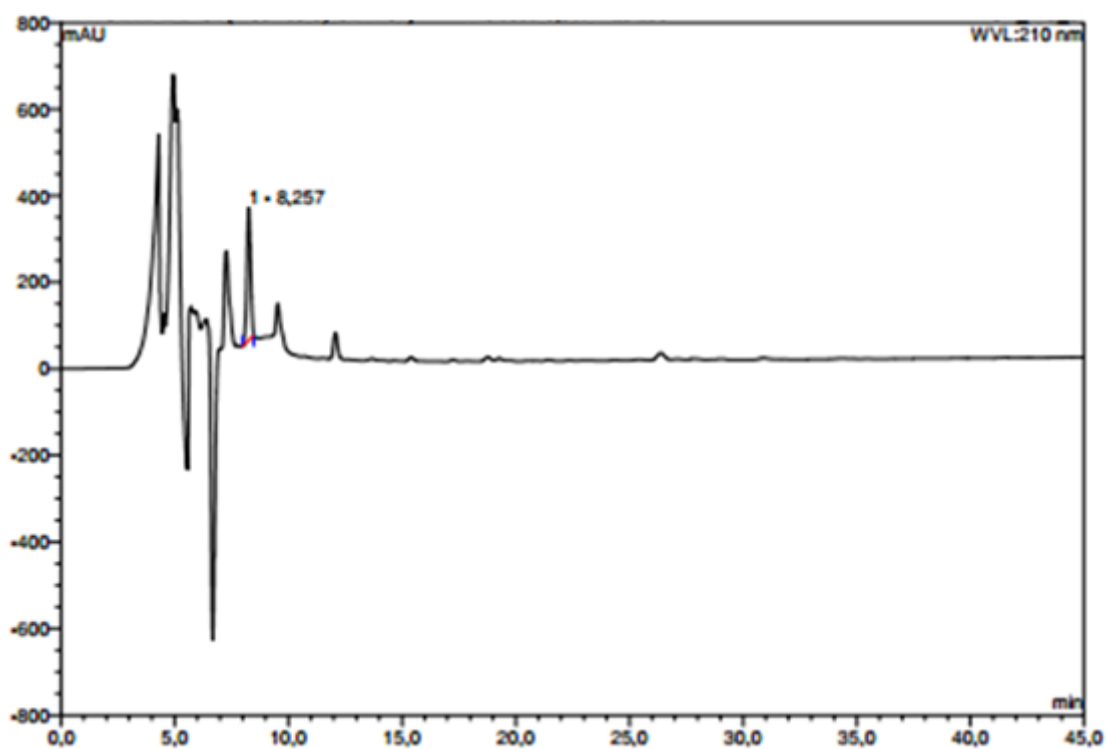
**ANEXO D – CROMATOGRAMA (CLAE-UV) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. NÃO IRRADIADO**



Condições cromatográficas descritas na seção Materiais e métodos.



**ANEXO E – CROMATOGRAMA (CLAE-UV) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. IRRADIADO**



Condições cromatográficas descritas na seção Materiais e métodos.