

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

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
FARMACOLÓGICAS E FARMACOGENÉTICAS DO  
EXTRATO E FRAÇÕES DA PLANTA *Pavonia  
xanthogloea* (Malvaceae)**

**TESE DE DOUTORADO**

**Clarice Pinheiro Mostardeiro**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**



**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E  
FARMACOGENÉTICAS DO EXTRATO E FRAÇÕES DA  
PLANTA *Pavonia xanthogloea* (Malvaceae)**

**Clarice Pinheiro Mostardeiro**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGF), Área de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

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

Mostardeiro, Clarice Pinheiro  
Avaliação das propriedades farmacológicas e farmacogenéticas do extrato e frações da planta Pavonia xanthogloea (Malvaceae) / Clarice Pinheiro Mostardeiro.- 2014.  
138 p.; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Pavonia xanthogloea 2. farmacogenética 3. polimorfismo Ala16Val-SOD2 4. câncer de próstata 5. erva de ovelha I. da Cruz, Ivana Beatrice Mânica II. Título.

---

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Clarice Pinheiro Mostardeiro. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço eletrônico: clarice.pm@hotmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Tese de Doutorado:

**Avaliação das propriedades farmacológicas e  
farmacogenéticas do extrato e frações da planta *Pavonia  
xanthogloea* (Malvaceae)**

elaborada por  
**Clarice Pinheiro Mostardeiro**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM/Orientadora)**

  
**Ademir Farias Morel, Dr. (UFSM)**

  
**Graciela Maldaner, Dra. (UNIPAMPA)**

  
**Maria Fernanda Mânica-Cattani, Dra. (UFSM)**

  
**Guilherme Bergamaschi Bresciani, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 31 de janeiro de 2014



Ao meu esposo, Marco Aurélio e ao meu filho, Paulo.  
Agradeço a Deus por ter colocado esses dois amores na  
minha vida.





## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pela sua orientação no desenvolvimento deste trabalho e, pela amizade, força, incentivo e carinho, o meu sincero agradecimento. Por ter sido mais que uma orientadora, uma verdadeira cuidadora que sempre tem uma mensagem de otimismo, um conselho, um abraço, que me ajuda a seguir em frente.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel e ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais da UFSM, cuja interação nos proporcionou, não apenas parte dos recursos para realização desta pesquisa, mas também compartilhou conhecimento, entusiasmo, dedicação e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Biogenômica, colegas e amigos: Greice, Maria Fernanda, Raul, Olmiro, Thais, Mara, Danise, Tális, Francine, Alencar, Eliza, Cristina, Pauline, Luana, Eduardo, Fernanda, Verônica, Micheli e Michele, Araê, Guilherme, Jéssica, Taís, em fim todos os alunos que estiveram ou estão integrando a equipe do laboratório. Que além da ajuda nos experimentos, sempre tinham um sorriso, um abraço, um aperto de mão.

Aos professores Rafael Noal Moresco, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte pela colaboração nas análises e conhecimentos transmitidos.

Aos professores Ademir Farias Morel, Ionara Irion Dalcol, Neuza Fernandes de Moura, Graciela Maldaner, Maria Fernanda Mânica-Cattani e Guilherme B. Bresciani, por se disponibilizarem avaliar e contribuir com este trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello e a Zeli Carvalho pela orientação, atenção e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo fomento a pesquisa.

À minha mãe Dalva, minha irmã Silvana e a todos meus familiares, obrigado pelo carinho e apoio.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.



## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E FARMACOGENÉTICAS DO EXTRATO E FRAÇÕES DA PLANTA *Pavonia xanthogloea* (MALVACEAE)**

Autor: Clarice Pinheiro Mostardeiro

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de janeiro de 2014.

O Bioma Pampa possui uma grande biodiversidade de plantas, entre as quais as da Família Malvaceae. Apesar do uso medicinal de muitas destas plantas, estudos sobre a atividade biológica das mesmas ainda são muito escassos. Este é o caso da planta conhecida como “erva de ovelha”, que é tradicionalmente utilizada na terapia contra o câncer de próstata, na forma de chá e preparado a partir de duas espécies do gênero *Pavonia*, com destaque a *Pavonia xanthogloea*. Portanto, o presente estudo teve como objetivo principal identificar compostos bioativos do extrato e cinco frações de *P. xanthogloea*, avaliando a sua ação antioxidante e antitumoral na linhagem de câncer de próstata DU145. Adicionalmente, o potencial efeito citotóxico via estudos farmacogenéticos em células sanguíneas vermelhas (RBCs) humanas, portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo encontrado no gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val-SOD2). Estas RBCs posteriormente foram expostas ao extrato e frações da *P. xanthogloea*. Os resultados obtidos foram organizados e apresentados sob a forma de três artigos científicos. Manuscrito 1: A composição química do extrato e frações (acetato de etila, n-butanol, hexano, aquosa e diclorometano) foi determinada por cromatografia de líquida de alta eficiência. A capacidade antioxidante foi determinada pelo ensaio do DPPH. A atividade antioxidante e a citotoxicidade avaliada através da exposição de linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de extrato/frações com e sem nitroprussiato sódico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O tilirosídeo foi encontrado em todos os extratos. As frações aquosa e acetato de etila mostraram alta capacidade antioxidante. O extrato bruto (etanólico) e frações hexano, aquosa e n-butanol revertem os níveis de ROS gerados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O extrato bruto e frações hexano, acetato de etila e n-butanol não causam citotoxicidade. A fração aquosa foi citotóxica na concentração de 300 µg/mL. A reversão da citotoxicidade causada pelo SNP foi dependente do extrato/fração e da concentração. A fração diclorometano foi citotóxica em todas as concentrações. O resultado sugere potencial uso medicinal desta espécie. Manuscrito 2: O estudo avaliou *in vitro* o efeito hemolítico da Queleritrina (CHE), alcaloide extraído da *Zanthoxylum rhoifolium*, e da possível influência farmacogenética da SOD2-Ala16Val em RBCs. A CHE inibe a atividade da proteína quinase C diminuindo a deformação das RBCs e causando estresse oxidativo. O sangue foi coletado de sujeitos saudáveis, previamente genotipados para o polimorfismo Ala16Val-SOD2. A CHE foi incubada com RBCs (1 × 10<sup>9</sup> cell/mL) nas concentrações 0.1 µM, 2 µM and 8 µM. O efeito farmacogenético foi avaliado através de análises espectrofotométricas de indicadores do estresse oxidativo, lipoperoxidação, catalase, produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP) e nitrato/nitrito (NOx), e hemólise. As RBCs foram mantidas em condições controladas. A resposta ao tratamento com CHE foi genótipo dependente e, RBCs AA foram mais sensíveis que as VV. A SOD2 tem um importante papel na eritropoiese e causa impacto

na qualidade das RBC. Portanto, os resultados aqui apresentados sugerem influência toxicogenética de SOD2 em ensaio hemolítico utilizando células humanas. Manuscrito 3: Para avaliar o efeito antitumoral foram feitos ensaios de viabilidade (24 horas de exposição) e proliferação celular (72 horas de exposição) e análise espectrofotométrica pelo ensaio MTT. O efeito farmacogenético através do ensaio de hemólise, por espectrofotometria. O sangue foi coletado de sujeitos saudáveis, previamente genotipados para o polimorfismo Ala16Val-SOD2. Tanto os eritrócitos quanto as células tumorais foram cultivadas em condições controladas. O estudo do padrão de hemólise associado aos diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 sugere efeito farmacogenético. Quando foi realizado ensaio de hemólise para diferentes concentrações do extrato e frações de *P. xanthogloea* o efeito anti-hemolítico protetor observado foi independente do gene da SOD2. Atividade citotóxica e antiproliferativa observada na linhagem celular de câncer de próstata DU145 foi dependente do tipo de extrato/fração e concentração, com destaque a fração butanol que apresentou intensa atividade antiproliferativa. Estes resultados apresentaram grande similaridade a atividade antitumoral do quimioterápico doxirrubicina e também parecem estar associados ao tilirosídeo, isolado da *P. xanthogloea*. O conjunto dos resultados condizem com o uso popular da *P. xanthogloea* em relação a terapia do câncer de próstata. Entretanto, investigações complementares devem ser feitas para avaliar os mecanismos de ação antitumorais da *P. xanthogloea*.

**Palavras-chave:** *Pavonia xanthogloea*. erva de ovelha. hemólise. farmacogenética. polimorfismo Ala16Val-SOD2. câncer de próstata. DU145.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Post-Graduate Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### EVALUATION OF PHARMACOLOGICAL AND PHARMACOGENETICS *Pavonia xanthogloea* (MALVACEAE) PROPERTIES

Author: Clarice Pinheiro Mostardeiro

Advisor: Prof<sup>a</sup> Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, January, 31, 2014.

The Pampa Biome has a great biodiversity of plants, among them the Family Malvaceae. Despite the medicinal use of many of these plants, studies on the biological activity of these are still very scarce. This is the case of the plant known as "erva de ovelha", which is traditionally used in therapy against prostate cancer, used as tea and prepared from two species of the genus *Pavonia*, highlighting the *Pavonia xanthogloea*. Therefore, this study aimed to identify bioactive compounds in the extract and five fractions of *P. xanthogloea*, evaluating their antioxidant and antitumor action in the lineage of prostate cancer DU145. Additionally, the potential cytotoxic effect via pharmacogenetic studies on human red blood cells (RBCs) bearers of different genotypes of the polymorphism found in the gene of the enzyme superoxide dismutase manganese dependent (Ala16Val-SOD2). These RBCs afterwards were exposed to extract and fractions of *P. xanthogloea*. The results were arranged and shown as three scientific papers. Manuscript 1: The chemical composition of the extract and fractions (ethyl acetate, hexane, n-butanol, aqueous and dichloromethane) was determined by liquid chromatography of high efficiency. The antioxidant activity was determined by DPPH assay. The antioxidant activity and the cytotoxicity evaluated by exposure of human lymphocytes exposed to different concentrations of extract/fractions with and without sodium nitroprusside and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tiliroside was found in all extracts. The aqueous and ethyl acetate fractions showed high antioxidant capacity. The crude extract (ethanol) and hexane, n-butanol and aqueous fractions reverts the ROS levels generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The crude extract and hexane, ethyl acetate and n-butanol fractions do not cause cytotoxicity. The aqueous fraction was cytotoxic at concentration of 300 µg/mL. The reversal of the cytotoxicity caused by SNP was dependent on the concentration and extract/fraction. The dichloromethane fraction was cytotoxic at all concentrations. The results suggest potential medicinal use of this species. Manuscript 2: The study evaluated *in vitro* the hemolytic effect of chelerythrine (CHE), alkaloid extracted from *Zanthoxylum rhoifolium*, and the possible pharmacogenetic influence of SOD2-Ala16Val in RBCs. The CHE inhibits protein kinase C activity decreasing the RBCs deformation and causing oxidative stress. Blood was collected from healthy subjects previously genotyped for the polymorphism Ala16Val-SOD2. The CHE was incubated with RBCs ( $1 \times 10^9$  cell/mL) at concentrations 0.1 µM, 2 µM and 8 µM. Pharmacogenetic effect was evaluated through spectrophotometric analysis of indicators of oxidative stress, lipid peroxidation, catalase, advanced oxidation protein products (AOPP) and nitrate/nitrite (NOx), and hemolysis. The RBCs were maintained under controlled conditions. The response to treatment with CHE was genotype dependent and AA RBCs were more sensitive than VV. The SOD2 plays an important role in erythropoiesis and causes an impact on the quality of RBC. Therefore, the results presented here suggest toxicogenetic influence of SOD2 in

hemolytic assay using human cells. Manuscript 3: To evaluate the antitumor effect viability assays of (24 hour exposure) and cell proliferation (72 hour exposure) were performed by MTT assay and spectrophotometric analysis. The pharmacogenetic effect through the hemolysis assay by spectrophotometry. Blood was collected from healthy subjects previously genotyped for the polymorphism Ala16Val-SOD2. Both erythrocytes and tumor cells were grown under controlled conditions. Study the pattern of hemolysis associated with different genotypes of the polymorphism Ala16Val-SOD2 suggests pharmacogenetic effect. When hemolysis assay was performed for different concentrations of extract and fractions of *P. xanthogloea* the anti-hemolytic protective effect observed was independent of the gene SOD2. Cytotoxic and antiproliferative activity was observed in the cell lineage of prostate cancer DU145 was dependent on the type of extract/fraction and concentration, highlighting n-butanol fraction that showed strong antiproliferative activity. These results showed great similarity to antitumor activity of doxorubicin chemotherapeutic and also seem to be associated with tiliroside isolated from *P. xanthogloea*. The overall results match with the popular use of *P. xanthogloea* regarding the prostate cancer therapy. However, further investigations should be performed to evaluate the antitumor action mechanisms of *P. xanthogloea*.

**Keywords:** *Pavonia xanthogloea*, “erva de ovelha”; hemolysis; pharmacogenetics; Ala16Val-SOD2 polymorphism, prostate cancer, DU145.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1-</b> Sistemática da Família Malvaceae: Fonte: informações contidas no trabalho de Grings e Boldrini (2013).....	24
<b>Figura 2-</b> Algumas flores de espécies pertencentes a Família Malvaceae (Fonte: fotos disponíveis na internet de acesso livre).....	25
<b>Figura 3-</b> Frequência dos principais estudos realizados com espécies de plantas da Família Malvaceae e publicados em revistas indexadas no Pubmed-Medline (2014).....	26
<b>Figura 4-</b> <i>Pavonia xanthogloea</i> (Ekman, Malvaceae). Foto: Eduardo Luís Hettwer Giehl disponibilizada na Flora Digital do RS.....	31
<b>Figura 5-</b> Potencial produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) associados a geração do estresse oxidativo. ....	35
<b>Figura 6-</b> Síntese do efeito farmacogenético de fármacos considerando a sua eficácia e segurança (modificado a partir de Metzger et al., 2006). Para a maior parte da população os fármacos são desenvolvidos com eficácia e segurança comprovada. Para alguns indivíduos este fármaco pode ser seguro, mas sem eficácia, para outros pode não ser seguro ainda que eficaz e para outros o mesmo não é nem seguro e nem eficaz.....	42
<b>Tabela 1-</b> Principais atividades biológicas descritas para espécies da Família Malvaceae (Fonte: estudos publicados em revistas indexadas no PUBMED-MEDLINE).....	27





## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ala16Val:** Polimorfismo SOD2

**MTS:** Mitochondrial targeting sequence (sequencia mitocondrial alvo)

**AOPP:** Produtos avançados da oxidação de proteínas

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**Bax:** Primeiro membro da família de proteínas Bcl-2 identificado

**Bcl-2:** B-cell lymphoma 2

**CAT:** Catalase

**CN:** Cianeto

**CONSEMA:** Conselho Estadual do Meio Ambiente

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DU145:** Linhagem de células de câncer de próstata

**eNOS:** Óxido nítrico sintetase endotelial

**ERNs:** Espécies reativas de Nitrogênio

**EROs:** Espécies Reativas de oxigênio

**GPX:** Glutathione peroxidase

**iNOS:** Óxido nítrico sintetase induzível

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido

**NK:** Células natural-killers

**nNOS:** Óxido nítrico sintetase neuronal

**NO:** Óxido nítrico

**NPS:** Nitroprussiato de sódio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Ânion superóxido

**OH:** Radical hidroxila

**OONO<sup>-</sup>:** Peroxinitrito

**SNO:** S-nitrosotiol

**SOD:** Superóxido dismutase

**SOD2 ou MnSOD:** Superóxido dismutase 2 ou dependente de manganês

**RAM:** Reações adversas a medicamentos

**CHE:** Chelerythrine



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 As Plantas e a Farmacologia.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Bioma Pampa e as plantas medicinais .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Família Malvaceae.....	23
1.2.2 Propriedades farmacológicas de espécies da Família Malvaceae .....	25
<b>1.3 O Gênero <i>Pavonia</i> .....</b>	<b>29</b>
1.3.1 Características e Uso Medicinal da <i>Pavonia xanthogloea</i> .....	31
<b>1.4 Estudos Exploratórios da Atividade Biológica de Plantas Nativas.....</b>	<b>32</b>
1.4.1 Atividade antioxidante das plantas .....	32
1.4.2 Atividade antitumoral das plantas .....	40
<b>1.5 Estudos farmacogenéticos aplicados à análise de segurança de plantas medicinais ..</b>	<b>41</b>
1.5.1 O polimorfismo genético Ala16Val da enzima Superóxido Dismutase dependente de Manganês (SOD2) .....	44
<b>1.6 Efeito da enzima SOD2 na biologia do eritrócito .....</b>	<b>46</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
2.1 Objetivo Geral .....	51
2.2 Objetivos Específicos.....	51
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
3.1. Manuscrito 1 .....	55
3.2 Manuscrito 2 .....	73
3.3 Manuscrito 3 .....	91
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>



# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 As Plantas e a Farmacologia

O uso de plantas com fins medicinais é uma prática que ocorre desde eras primitivas. Uma revisão sobre o tema feita por Crag e Newmann (2013) relata que, no Ocidente, documentos relacionados ao uso tradicional de plantas para o tratamento de doenças datam de 2600 a.C onde, na Mesopotâmia cerca de 1.000 substâncias derivadas de plantas já haviam sido descritas. Entretanto, o melhor acervo de documentos sobre o uso de plantas medicinais foi encontrado no Egito. No “Ebers Papyrus”, datado de 1500 a.C, foram descritos 700 fármacos dos quais a maioria é de origem vegetal. A civilização Greco-Romana também contribuiu muito para o desenvolvimento racional dos fármacos originários de plantas. Por exemplo, o médico Dioscorides (100 a.C) descreveu de modo bastante acurado como usar e armazenar uma série de ervas medicinais. Galeano (1330-200 a.C) também é muito conhecido por descrever fórmulas e prescrições usadas no tratamento de muitas doenças. É interessante comentar que, muitas das informações sobre plantas medicinais da civilização Greco-Romana foram preservadas pelos Árabes já que durante a Idade Média, as mesmas foram banidas e perdidas na Europa. O Oriente também possui relatos muito antigos de plantas medicinais. Na China existem vários documentos antigos relatando o uso de plantas medicinais, muitas das quais são bastante utilizadas até os dias de hoje (CRAG; NEWMANN, 2013).

Na atualidade, o uso de plantas medicinais ainda continua. Informações disponibilizadas pela Organização Mundial da Saúde estimam que aproximadamente 65% da população mundial utilizam predominantemente fitoterápicos no tratamento de muitas disfunções e doenças. Já na indústria farmacêutica, um levantamento realizado por Graham (2000), sobre o uso de substâncias puras derivadas de plantas utilizadas em diversos países identificou 122 moléculas comuns, das quais, 80% são utilizadas do mesmo modo e derivadas de somente 94 espécies de plantas.

Em termos científicos, pesquisas farmacológicas envolvendo plantas medicinais podem ser feitas através de quatro tipos básicos de abordagem, como salientam Albuquerque e Hanazaki (2006).

A primeira a ser citada é a abordagem randômica, pelo qual se fazem coletas de planta ao acaso, em uma determinada área, e posteriormente se realizam triagens fitoquímicas e farmacológicas destas plantas. Esta abordagem é bastante criticada devida a aleatoriedade e a muitas vezes pela ausência de critérios. Na abordagem quimiotaxonômica ou filogenética, o estudo concentra-se na seleção de espécies de uma família ou gênero para as quais se tenha algum conhecimento fitoquímico de, ao menos uma espécie do mesmo grupo taxonômico. Também a delimitação do foco de investigações sobre efeitos farmacológicos de plantas pode ser feito através da chamada abordagem etológica. Nesta abordagem, a escolha da planta ou das plantas a serem investigadas é realizada a partir do estudo do comportamento de animais nativos que consomem determinadas plantas quando apresentam algum tipo de disfunção ou doença. Por fim o quarto tipo de abordagem é conhecida como “abordagem etnodirigida”. Esta consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de uso por grupos populacionais específicos, enfatizando a busca pelo conhecimento construído. Ou seja, é uma abordagem baseada no conhecimento tradicional de uma determinada população ou mesmo no uso popular de uma planta medicinal, por determinada população (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

O uso destas quatro abordagens tem permitido, não só a identificação, mas o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais utilizados para o tratamento de diversas doenças, como é o caso das morbidades crônico-degenerativas associadas ao envelhecimento humano. Entre estas, se destacam as doenças cardiovasculares e as neoplasias.

Apesar da grande diversidade étnica que existe no Brasil do qual a abordagem etnodirigida pode ser aplicada, estudos científicos sobre plantas medicinais utilizadas por populações tradicionais (indígenas, quilombolas e ribeirinhas) ainda são bastante restritos. Por outro lado, existem regiões geográficas em que muitas informações da medicina tradicional foram perdidas ou mesmo se tornaram imprecisas ou difusas com o passar do tempo (ROESCH et al., 2009).

Este é o caso do que ocorre na região do Bioma Pampa localizado no Rio Grande do Sul. No período Pré-Colombiano o Rio Grande do Sul foi colonizado principalmente por quatro grandes populações indígenas: os Guaranis, os Kaingangs, os Charruas e Minuanos. Entretanto, essas duas últimas populações citadas é que habitavam predominantemente a região constituída pelo Bioma Pampa, enquanto as outras estavam localizadas mais nas regiões constituídas pelo Bioma Mata Atlântida. Porém, os Charruas e Minuanos, que têm sua origem na região da Patagônia (Argentina) e, posteriormente migraram e ocuparam o Bioma

Pampa, foram praticamente extintos ao longo da colonização europeia. Ainda que, em 2007 o povo Charrua voltou a ser oficialmente reconhecido pela FUNAI, a maior parte dos aspectos etnoculturais deste povo foi perdida, se diluiu ou foi mesclada nos usos e costumes da população contemporânea que habita esta parte geográfica do estado do Rio Grande do Sul (ROESCH et al., 2009).

Por este motivo, o resgate do potencial farmacológico de espécies nativas do Bioma Pampa precisa ser feito por outra abordagem complementar a abordagem etnodirigida, já que esta não consegue ser aplicada de modo adequado segundo os seus pressupostos metodológicos. Deste modo a interação da abordagem etnodirigida com a abordagem quimiotaxônomica parece ser um modo cientificamente aceitável para o desenvolvimento de estudos farmacológicos com base nas plantas do Bioma Pampa. Neste caso, as referências do potencial uso farmacológico de espécies nativas do Bioma Pampa, devem também ser obtidas a partir evidências de atividade biológica descritas em espécies ou gêneros estudados em outras regiões das Américas ou mesmo do mundo.

## **1.2 Bioma Pampa e as plantas medicinais**

O planeta é constituído por biomas que são definidos como áreas biológicas ou espaço geográfico com características específicas de macroclima, fitofisionomia, solo e altitude. Assim, cada bioma possui comunidades biológicas, ou seja, populações de organismos da fauna e da flora, que interagem entre si e também com os fatores ambientais abióticos existentes. Este conceito foi utilizado pela primeira vez pelo naturalista Clements, em 1949 e posteriormente evoluiu (COUTINHO, 1978).

Considerando os demais biomas identificados no mundo, o Bioma Pampa é bastante novo, sendo reconhecido como tal somente no ano de 2004. Este bioma ocorre no Brasil somente no estado do Rio Grande do Sul, possuindo uma extensão de 176.496 Km<sup>2</sup> representando 63% de todo o território do Estado. A paisagem deste bioma é fortemente caracterizada pela existência de grandes áreas de planície, algumas colinas (popularmente denominadas “coxilhas”), que são cobertas de vegetação campestre. Existem também algumas áreas com arbustos e matas. Zarth e Gerhardt (2009) descrevem que o Bioma Pampa, também conhecido como campos sulinos, possui quatro conjuntos principais de fitofisionomias campestres naturais: Planalto da Campanha, Depressão Central, Planalto Sul-Rio-Grandense e

Planície Costeira. Estes conjuntos possuem diferentes composições de solo e de cobertura vegetal, predominando a vegetação herbácea e arbustiva e um relevo aplainado e suavemente ondulado (IBGE, 2004).

Até há pouco tempo o Bioma Pampa não era considerado uma área com potencial detecção de plantas medicinais. Isto porque, por ser uma área extensa com predomínio de gramíneas, a região historicamente era considerada como um “vazio ecológico”, do qual se pressupunha haver uma biodiversidade bastante reduzida. Entretanto, o paradigma da “pobreza de espécies” foi sendo desconsiderado na medida em que foi identificado um grande número de espécies. Hoje se estima que o Bioma Pampa possua, ao contrário do que se pensava, uma biodiversidade impressionante, composta por 2.500 espécies de plantas vasculares, aproximadamente 450 gramíneas, 150 leguminosas, cerca de 70 tipos de cactos e de plantas de outras famílias (ZARTH; GERHARDT, 2009).

A descoberta tardia da grande biodiversidade do Bioma Pampa também tem levado a conscientização de que muitas das plantas nativas estão em risco de extinção. Isto porque, além da perda de informações etnoculturais, sobre o uso de plantas medicinais pelos povos nativos do Bioma Pampa, a agricultura mecanizada de monocultivos, visando à produção de alimentos ou de madeira, alterou a paisagem e as características naturais de parte dos campos sulinos. Deste modo, existe um grande risco de perda irreversível de diversidade da flora campestre do pampa (BOLDRINI, 1998). Este é, por exemplo, um fenômeno corrente nos campos naturais do Estado do Rio Grande do Sul. Os campos, antes ocupavam aproximadamente 37% da sua superfície e, eram tradicionalmente utilizados na criação de gado. Entretanto, esta formação inicial vem sendo cada vez mais diminuída com o passar dos anos em consequência da retirada da cobertura vegetal original principalmente associada a agricultura (BOLDRINI, 1998; ROESCH et al., 2009).

Considerando a cobertura vegetal do Bioma Pampa, duas famílias de plantas são bastante representativas nos campos sulinos: as gramíneas e as leguminosas. Porém, uma terceira família a Malvaceae se destaca ainda que também sejam potencialmente afetadas pela diminuição das áreas de cobertura vegetal. Assim, pesquisas relacionadas à conservação destas espécies são de grande interesse. Entretanto, além de estudos ecológicos sobre a estrutura das comunidades dos campos sulinos, estudos de caracterização das propriedades químico-funcionais destas espécies tanto na saúde humana quanto na saúde animal são de grande interesse científico e econômico (ROESCH et al., 2009). Além da Malvaceae as famílias Rhamnaceae, Anacardiaceae e Rutaceae se destacam por apresentarem constituintes



com potencial farmacológico (MOSTARDEIRO et al., 2013; GEHRKE et al., 2013; TREVISAN et al., 2009; DE ADREU GONZAGA et al.; 2003).

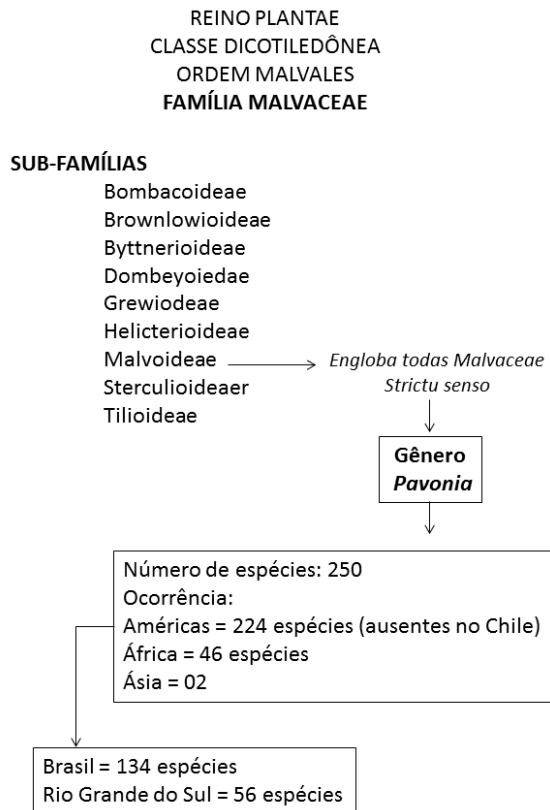
### 1.2.1 Família Malvaceae

Muitas espécies de ervas, subarbustos, arbustos e lianas encontradas no Bioma Pampa pertencem família Malvaceae. Esta família de plantas possui cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies no mundo (Figura 1). Representantes desta família estão distribuídos principalmente nas regiões tropicas e temperadas do globo terrestre (FRYXELL, 1997). No caso, a América do Sul é muito rica nestas espécies, sendo estimada a ocorrência de 65% dos gêneros nesta região do globo terrestre. A lista de espécies da Flora do Brasil descreve 69 gêneros e 754 espécies da Família Malvaceae (BOVINI et al., 2013).

A família Malvaceae *lato sensu* engloba espécies da Família Malvaceae *stricto sensu* e também de mais três famílias de plantas: Bombacaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae todas elas inseridas na Ordem Malvales (GRINGS et al., 2011).

No Rio Grande do Sul ainda existem poucos estudos que envolvem gêneros e espécies da Família Malvaceae *stricto sensu*, sendo que em 1934 Bornmüller registrou a ocorrência de 14 espécies de Malvaceae. Somente na década de 60 é que foi feito um registro mais detalhado, quando Rambo (1967) enumerou 11 gêneros e 56 espécies da família para o Estado detalhando informações relacionadas a distribuição geral, hábito, habitat. Infelizmente, trabalhos contemporâneos sobre a taxonomia da família no Rio Grande do Sul, ainda continuam escassos sendo, os mais relevantes, os desenvolvidos por Bueno e Krapovickas (1994), Bueno (1995), Grings et al., (2011, 2012).

Em geral as plantas da Família Malvaceae podem ser vegetativamente reconhecidas pela casca fibrosa, folhas alternas, estipuladas, com margens recortadas, com venação palmatinérvea, com indumento estrelado ou lepidoto. As flores geralmente possuem um cálice valvar e conado, com nectários na base interna e uma corola imbricada. Os estames são geralmente numerosos e variadamente conados (GRINGS et al., 2011). Geralmente as flores de espécies da Família Malvaceae são muito chamativas e por este motivo são utilizadas na jardinagem (Figura 2).



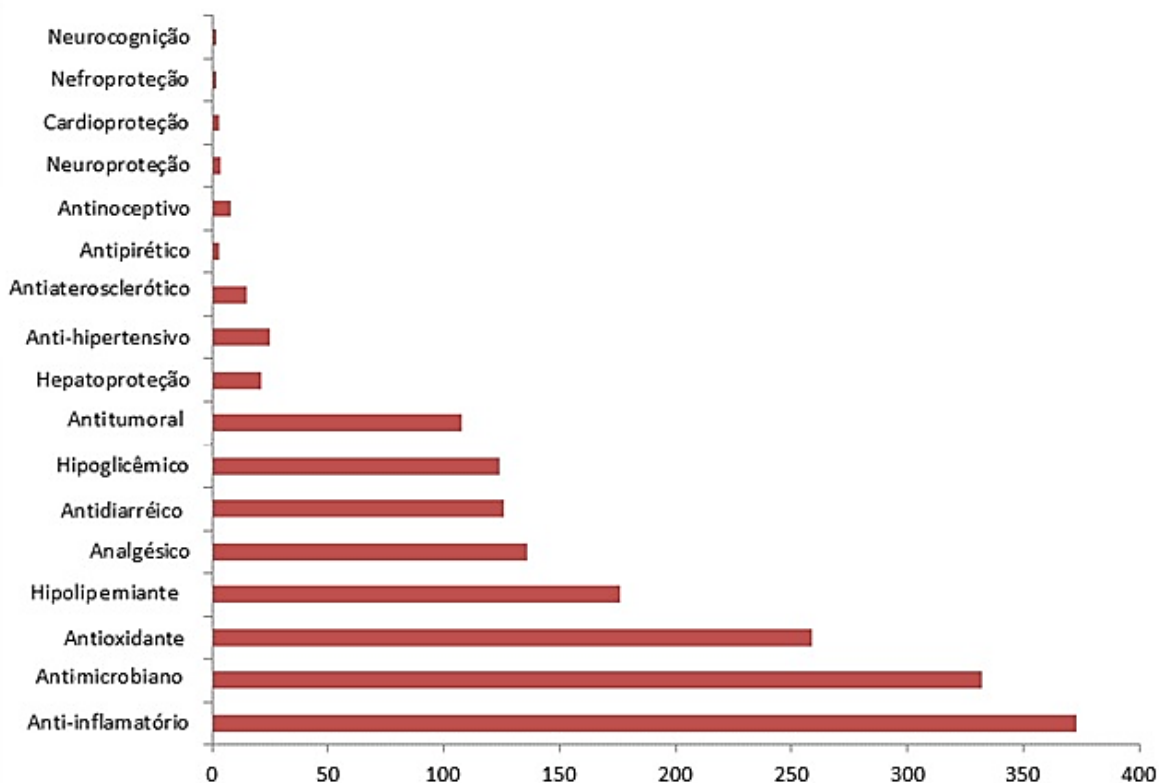
**Figura 1-** Sistemática da Família Malvaceae: Fonte: informações contidas no trabalho de Grings e Boldrini (2013).



**Figura 2-** Algumas flores de espécies pertencentes a Família Malvaceae (Fonte: fotos disponíveis na internet de acesso livre).

### 1.2.2 Propriedades farmacológicas de espécies da Família Malvaceae

Como existem espécies da Família Malvaceae que são utilizadas como fitoterápicos, na medicina popular de diversos países, esta condição permite que seja aplicada a abordagem quimiotaxonômica, para identificar atividades biológicas descritas em espécies e gêneros relacionados aos presentes no Bioma Pampa. Uma busca por estudos publicados na literatura científica, listados pelo indexador de revistas científicas PUBMED – MEDLINE da Biblioteca Nacional os Estados Unidos (*US National Library of Medicine National Institutes of Health*), mostrou um total de 5163 trabalhos com espécies da Família Malvaceae (PUBMED,2014). A maior parte dos estudos avaliou o efeito anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, hipolipemiante e analgésico de espécies desta família (Figura 3).



**Figura 3-** Frequência dos principais estudos realizados com espécies de plantas da Família Malvaceae e publicados em revistas indexadas no Pubmed-Medline (2014).

Considerando os 30 gêneros da Família Malvaceae que são listados na Flora Digital do Rio Grande do Sul, foi possível identificar trabalhos publicados e indexados no PUBMED-MEDILINE de espécies pertencentes a 23 gêneros, sendo que a grande maioria dos estudos concentraram-se em espécies do gênero *Hibiscus* e *Sida*. A Tabela 1 apresenta uma listagem de espécies da Família Malvaceae com diferentes atividades biológicas, com destaque as nativas do Rio Grande do Sul que foram grifadas em negrito.

**Tabela 1** - Principais atividades biológicas descritas para espécies da Família Malvaceae (Fonte: estudos publicados em revistas indexadas no PUBMED-MEDLINE).

<b>Atividade Biológica</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
Antioxidante	<i>Abutilon indicum</i> <i>Abutilon muticum</i> <i>Triumfetta rhomboidea</i> <i>Cienfuegosia digitata</i>	TIAN et al., 2012 YASMIN et al., 2010 LISSY et al., 2006 KONATÉ et al., 2010
Anti-inflamatória	<i>Heritiera littoralis</i> <i>Abelmoschus esculentus</i> <i>Croton crassifolius</i> <b><i>Sida rhombifolia</i></b> <i>Thespesia populnea</i> <i>Malva parviflora</i> <i>Wercklea insignis</i> <i>Abutilon indicum</i> <i>Waltheria indica</i>	ALARCÓN-ALONSO et al., 2012 TEWTRAKUL et al., 2010 DE SOUZA et al., 2012 ZHAO et al., 2012 NARENDHIRAKANNAN E LIMMY, 2012 SHAH E ALAGAWADI, 2011 BOURICHE et al., 2011 PARK et al., 2012 TEWTRAKUL et al., 2010; KUO et al., 2008 ZONGO et al., 2013
Antimicrobiana	<i>Hibiscus cannabinus</i> <i>Sida tiagii</i> <i>Cienfuegosia</i> <i>Herissantia tiubae</i> <i>Sida alba</i> <i>Melochia odorata</i> <i>Urena lobata</i>	BINDHU E UMADEVI 2013 DATUSALIA et al., 2012 KONATÉ et al., 2012a FALCÃO-SILVA et al., 2009 KONATÉ et al., 2012b EMILE et al., 2007 MAZUMDER et al., 2001
Antimalarica	<b><i>Abutilon grandiflorum</i></b> <i>Sida acuta</i>	BEHA et al., 2004 BANZOUZI et al., 2004
Anti-hipertensiva	<i>Hibiscus sabdariffa</i> <b><i>Guazuma ulmifolia</i></b>	ALARCON-AGUILAR et al., 2007 CABALLERO-GEORGE et al., 2002
Hipolipimiente	<b><i>Hibiscus rosa sinensis</i></b> <i>Hibiscus schizopetalus</i> <i>Hibiscus sabdariffa</i> <i>Abelmoschus manihot</i> <i>Hibiscus sabdariffa</i> <i>Abutilon indicum</i>	KUMAR et al., 2009; 2013 KUO et al., 2013 PENG et al., 2011 AN et al., 2011 EKOR et al., 2010 YANG et al., 2010 GURROLA-DÍAZ et al., 2010 MOZAFFARI-KHOSRAVI et al., 2009 SEETHARAM et al., 2002
Antiaterogênica	<b><i>Sida rhomboidea</i></b>	THOUNAOJAM et al.; 2012a CHEN et al., 2013 THOUNAOJAM et al., 2011
Hipoglicêmica	<i>Hibiscus taiwanensis</i> <i>Sida tiagii</i> <i>Malva parviflora</i> <i>Hibiscus sabdariffa</i>	ZAHID et al., 2014 DATUSALIA et al., 2012 PEREZ GUTIERREZ, 2012; PENG et al., 2011
Antiobesogênica Atenuação da esteatose hepática	<i>Hibiscus sabdariffa</i> <i>Hibiscus sabdariffa</i> <b><i>Sida rhomboidea</i></b>	ALARCON-AGUILAR et al., 2007 VILLALPANDO-ARTEAGA et al., 2013 THOUNAOJAM et al., 2012b

Continua...

Atividade Biológica	Espécie	Referência
Hepatoproteção	<i>Hibiscus vitifolius</i>	SAMUEL et al., 2012
	<i>Abutilon indicum</i>	PORCHEZHIAN et al., 2005
	<i>Melochia corchorifolia</i>	RAO et al., 2013
Nefroproteção	<b><i>Sida urens</i></b>	SREEDEVI et al., 2009
	<i>Malva sylvestris</i>	MAROUANE et al., 2011
Cardioproteção	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	LEE et al., 2009
	<b><i>Sida rhomboidea</i></b>	THOUNAOJAM et al., 2008
Neuroproteção, neurocognição	<i>Sida cordifolia</i>	KUBAVAT; ASDAQ, 2009
	<i>Gossypium herbaceum</i>	JI et al., 2012
	<i>Abelmoschus manihot</i>	LIU et al., 2012
Antidiarréico	<i>Thespesia populnea</i>	CHENG et al., 2006
	<i>Croton crassifolius</i>	VASUDEVAN E PARLE, 2006
	<i>Thespesia populnea</i>	VISWANATHA et al., 2011
Antinoceptiva	<i>Thespesia populnea</i>	ZHAO et al., 2012
	<b><i>Malvastrum coromandelinum</i></b>	SHAH E ALAGAWADI, 2011
	<b><i>Sida urens</i></b>	REDDY et al., 2001
Antipirética	<i>Thespesia populnea</i>	KONATÉ et al., 2013
	<i>Sida cordifolia</i>	SHAH E ALAGAWADI, 2011
Analgésica	<i>Sida acuta</i>	REJITHA et al., 2012
	<i>Abelmoschus manihot</i>	KONATÉ et al., 2012c
Osteoporose	<i>Abelmoschus manihot</i>	PUEL et al. 2005
Larvicida	<i>Pavonia</i>	VAHITHA et al., 2002
	<i>Abutilon indicum</i>	RAHUMAN et al., 2008
Atividade Antitumoral		
Câncer colorretal	<i>Hibiscus cannabinus</i>	ABD GHAFAR et al., 2013
	<i>Microcos paniculata</i>	STILL et al, 2013
	<i>Abelmoschus moschatus</i>	GUL et al., 2011;
Mieloma múltiplo	<i>Corchorus olitorius</i>	DARCANSOY et al. 2013
	<i>Reevesia formosana</i>	CHANG et al., 2013
Câncer de mama	<i>Sterculia tavia</i>	DA SILVA et al., 2012
	<i>Hibiscus mutabilis</i>	LAM et al., 2009
	<b><i>Luehea candicans</i></b>	DA SILVA et al., 2012
	<i>Reevesia formosana</i>	CHANG et al., 2013
Câncer de Pulmão	<i>Hibiscus syriacus</i>	CHENG et al., 2008
	<b><i>Luehea candicans</i></b>	DA SILVA et al., 2012
	<i>Sterculia taiva</i>	DAI et al., 2012
Câncer de Ovário	<b><i>Luehea candicans</i></b>	DA SILVA et al., 2012
Câncer de Próstata	<i>Sterculia tavia</i>	DA SILVA et al., 2012
Câncer de Cérebro	<i>Althaea rosea</i>	CHOI et al., 2012
Melanoma	<i>Thespesia populnea</i>	LI et al., 2013
Retinoblastoma	<i>Abelmoschus moschatus</i>	GUL et al., 2011
Câncer de cólon	<i>Hibiscus cannabinus</i>	MOUJIR et al., 2007
Câncer Gástrico	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	LIN et al., 2007
Leucemia	<i>Hibiscus anthocyanin</i>	HOU et al., 2005
	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	CHANG et al., 2005
Câncer de pele	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	SHARMA et al., 2004
	<b><i>Luehea candicans</i></b>	DA SILVA et al., 2012

\*Espécies em negrito ocorrem no Bioma Pampa, Rio Grande do Sul, Brasil.

Apesar dos poucos estudos realizados sobre atividade biológica em espécies da Família Malvaceae as evidências indicam um grande potencial de atividade biológica das

mesmas, subsidiada pelo uso popular nas populações que hoje ocupam as áreas do Bioma Pampa do Rio Grande do Sul.

### 1.3 O Gênero *Pavonia*

Um dos gêneros, cujas espécies precisam ser mais bem investigadas quanto o seu potencial uso terapêutico é o gênero *Pavonia* uma vez que existe uso medicinal popular envolvendo espécies de *Pavonia* na região do Bioma Pampa. Também porque o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA) do Estado do Rio Grande do Sul, assim como outras instituições nacionais, consideram espécies do gênero *Pavonia* como vulneráveis a extinção. Deste modo pesquisas sobre características fitoquímicas e biológicas destas espécies são de interesse científico.

Geralmente, representantes do gênero *Pavonia* são industrialmente utilizados na cordoaria e produção de celulose por serem espécies bastante fibrosas. Já, outras espécies são utilizadas como plantas ornamentais (SHUKLA et al., 1961).

Muitas espécies de ervas, subarbustos, arbustos e lianas encontradas no Bioma Pampa pertencem ao gênero *Pavonia*. Este gênero foi descrito inicialmente por Cavanilles (1787) de 13 espécies identificadas. Entretanto, novas espécies foram identificadas, sendo o gênero *Pavonia* provavelmente o maior da família Malvaceae. Atualmente, 250 espécies foram identificadas sendo das quais 244 ocorrem nas Américas. Estudos botânicos registraram que no Rio Grande do Sul (Figura 2) ocorrem 14 espécies de malváceas deste gênero sendo que a maioria ocorre em formações campestres subarbusivas e arbustivas, transições floresta-campo, campos pedregosos e áreas alteradas, como margens de rodovias (GRINGS et al., 2011).

Conforme a revisão sobre o gênero *Pavonia* no Rio Grande do Sul feita por Grings et al., (2011, 2012) os trabalhos mais relevantes sobre o mesmo foram os realizados pelos pesquisadores argentinos Antônio Krapovickas e Carmen Cristóbal, pelo norte-americano Fryxell e pela brasileira Gerleni Lopes Esteves. Entretanto, os estudos sobre o gênero *Pavonia* correntemente feitos pelos pesquisadores gaúchos, Martin Grings e Ilsi Iob Boldrini são de grande relevância.

O estudo realizado por eles foi feito em todas as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul a partir de 20 expedições e adicionalmente foi revisado o material de 20 herbários do

Brasil, Uruguai e Argentina. A partir desta investigação foi possível catalogar 34 espécies, sendo que 31 delas foram coletadas e apenas três foram identificadas a partir de exsicatas. Entre estas, três foram novas espécies descritas pelos pesquisadores.

Entre as espécies de *Pavonia* presentes no Rio Grande do Sul, encontra-se a *Pavonia xanthogloea*, Ekman. Na chave de classificação das espécies do Gênero, descritas em Grings et al., (2011), *P. xanthogloea* é identificada por possuir pétalas brancas ou branco-rosadas, com nervuras vináceas e com mancha basal vinácea na face adaxial das pétalas; mericarpos levemente tuberculados, tubo estaminal, presença de tufo de tricomas simples e setosos na base da face abaxial das lâminas foliares (Figura 3).

Esta espécie tem como habitat os Biomas Pampa e Mata Atlântica ocorrendo em capoeiras, campos arbustivos e bordas de floresta (GRINGS et al., 2011). Ela se distribui geograficamente na Argentina (Buenos Aires, Entre-Rios, Corrientes e Misiones), Paraguai, Uruguai e Brasil. No Brasil sua ocorrência é restrita ao Rio Grande do Sul sendo encontrada amplamente distribuída na Encosta da Serra do Sudeste, Serra do Sudeste, Depressão Central, Campanha, Missões, Alto Uruguai, Planalto Médio, Encosta Inferior do Nordeste, Encosta Superior do Nordeste e na porção oeste dos Campos de Cima da Serra. Apenas na região litorânea esta espécie não foi coletada (GRINGS; BOLDRINI, 2013). A floração e frutificação da espécie ocorrem entre dezembro a maio.

Como foi comentado anteriormente, no gênero *Pavonia* também são encontradas espécies utilizadas na medicina popular o qual são atribuídas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas, para tratar distúrbios gastrointestinais como disenteria e hemorragia intestinal e também no tratamento do câncer de próstata (SHUKLA et al., 1961). Apesar do uso popular, investigações científicas relacionadas às espécies do gênero *Pavonia* são ainda bastante incipientes.

Alguns poucos estudos relataram que as espécies *Pavonia odorata* e *Pavonia urens* (DE BOER et al., 2005) possuem atividade antimicrobiana enquanto que a espécie *Pavonia zeylanica* possui atividade larvicida (VAHITHA et al., 2002). A investigação conduzida por Garcia (2007) confirmou a atividade antimicrobiana e também descreveu atividade analgésica relacionada a compostos bioativos que incluem flavonóides glicosilados, tilirosídeo e astragalina. Muitos destes flavonóides, como é o caso do tilirosídeo apresentam poderosa atividade antioxidante, antiproliferativa e citotóxica (TSIMPLOULI et al., 2012).





**Figura 4-** *Pavonia xanthogloea* (Ekman, Malvaceae). Foto: Eduardo Luís Hettwer Giehl disponibilizada na Flora Digital do RS.

De fato os metabolitos secundários com baixo peso molecular encontrados nas espécies do gênero *Pavonia* são caracterizados por apresentarem estruturas químicas variáveis que possuem um número considerável de propriedades biológicas incluindo não somente atividade antimicrobiana e antioxidante, mas também atividade anticarcinogênica. Estes compostos bloqueiam a iniciação da carcinogênese através da inativação de moléculas genotóxicas exógenas e endógenas incluindo EROs (RUSSO e CESÁRIO, 2012).

#### 1.3.1 Características e Uso Medicinal da *Pavonia xanthogloea*

Na região do Bioma Pampa do Rio Grande do Sul é comum o uso do “chá de erva de ovelha” para tratar algumas doenças e disfunções. A “erva de ovelha” é usada na medicina tradicional gaúcha para tratar infecções bacterianas e também no tratamento do câncer de próstata (GARCIA, 2007). Entretanto, a “erva de ovelha” utilizada pela população é

composta, não por uma, mas por duas espécies: a espécie *Pavonia xanthogloea* e a *Pavonia distinguenda*. Ambas guardam muitas semelhanças morfológicas, por serem plantas de porte pequeno, com flores rosadas o que torna difícil a sua distinção por pessoas leigas.

Um estudo fitoquímico da espécie *P. distinguenda* foi realizado por Garcia (2007) que isolou flavonóides glicosilados tilirosídeo e astragalina,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, taraxerol, germanicol nas partes aéreas da planta. A autora também observou que o extrato bruto desta espécie apresentou citotoxicidade para larvas de *Artemia salina* bem como atividade antitumoral e analgésica. Entretanto, não foram identificados estudos para a espécie *P. xanthogloea*. Por este motivo, investigações relacionadas a esta espécie podem ser consideradas pioneiras.

#### **1.4 Estudos Exploratórios da Atividade Biológica de Plantas Nativas**

A análise das propriedades biológicas antioxidantes e antitumoral é justificada com base no levantamento das atividades biológicas, previamente descritas para plantas da Família Malvaceae, sua composição química e indicações de uso etnobotânico da *Pavonia xanthogloea*.

##### **1.4.1 Atividade antioxidante das plantas**

Estudos bioquímicos e farmacológicos realizados na metade do século XX identificaram um conjunto de moléculas conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas a partir de uma série de processos biológicos. As EROs são moléculas altamente reativas cuja principal origem endógena é a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (Figura 5). Esta sequência de reações químicas, que envolvem o oxigênio e a glicose, permite que o organismo aeróbio produza energia (adenosina trifosfato, ATP) (HALLIWELL, 1994).

As células e tecidos convertem continuamente uma pequena proporção de oxigênio molecular (~5%), que sofre redução univalente e se converte no ânion superóxido. Outras

EROs também são produzidas por outras vias metabólicas incluindo a explosão respiratória que ocorre nos fagócitos ativados ou como subprodutos de diversas enzimas celulares como a NADPH oxidases, a xantina oxidase e a óxido nítrico sintetase endotelial não acoplada (DRÖGE, 2002).

Por se tratarem de moléculas cujos átomos contêm um ou mais elétrons não pareados, altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas, as EROs são também classificadas como radicais livres. Os radicais livres também incluem moléculas reativas como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (HALLIWELL, 1994).

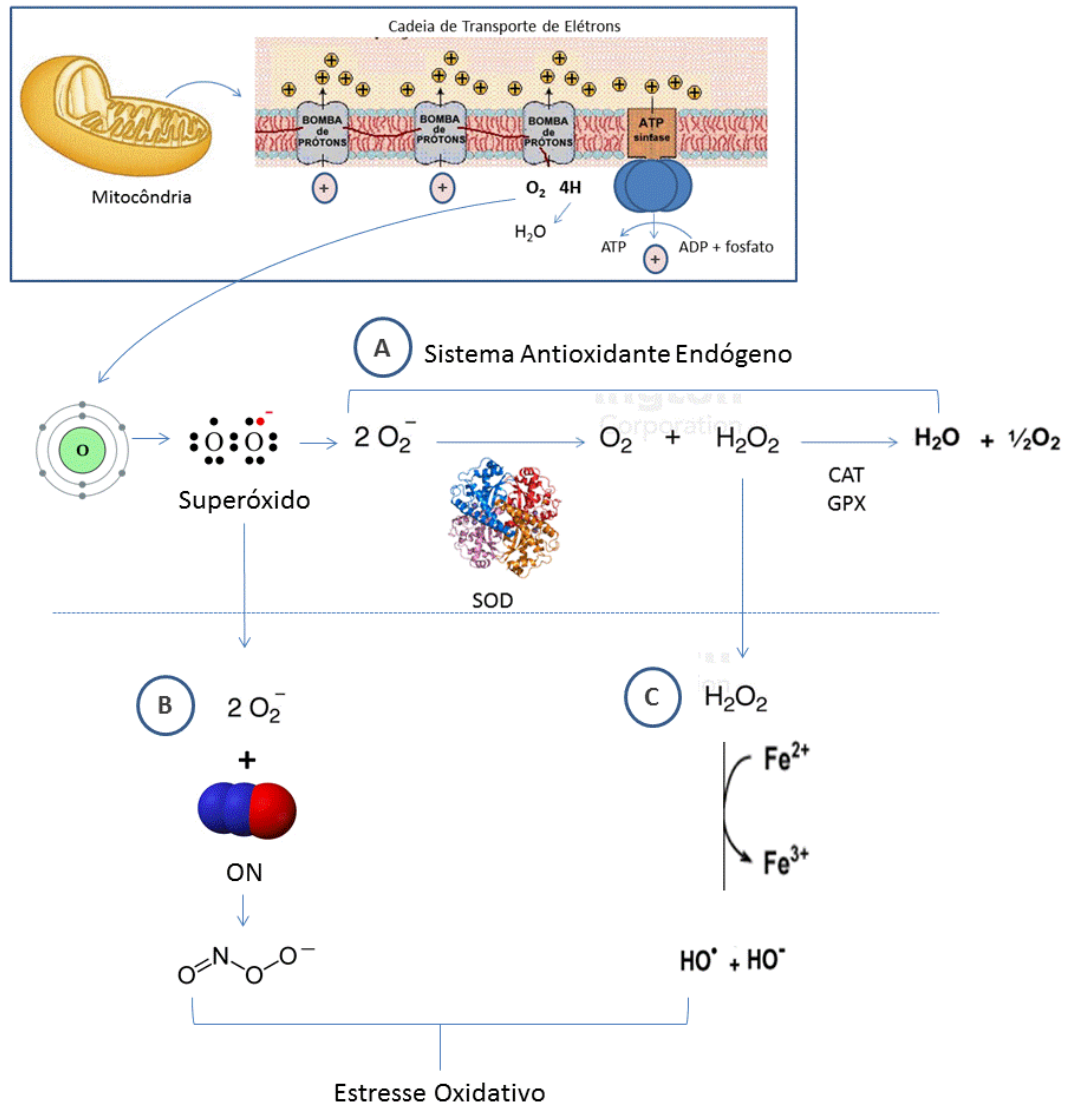
No organismo, os níveis de radicais livres, em particular das EROs, precisam ser rigorosamente controlados a fim de garantir que a sua produção e catálise sejam as desejáveis para cada tipo de célula conforme o seu momento ontogenético ou em resposta a fatores ambientais. Isto porque, ao contrário do que inicialmente se pensava, a presença de EROs e outras moléculas consideradas radicais livres é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997). Para regular as EROs a níveis desejáveis o organismo possui dois sistemas antioxidantes, um endógeno e outro exógeno.

O sistema endógeno (Figura 5) envolve uma cadeia enzimática na qual o ânion superóxido é dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) na molécula de peróxido de hidrogênio e esta serve como substrato das enzimas glutaciona peroxidase (GPX) e catalase (CAT) que a transformam em água e oxigênio (Figura 5A). No caso, existem três tipos distintos de SOD no ser humano: duas são dependentes do cobre e zinco e uma dependente de manganês (SOD2 ou MnSOD) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A SOD2 é uma enzima nuclear com função antioxidante cuja atividade ocorre especificamente no interior da mitocôndria. Já o sistema antioxidante exógeno envolve, na sua maior parte, compostos químicos oriundos da dieta que têm a capacidade de ligar às EROs e equilibrarem estas moléculas sem a necessidade de ação metabólica enzimática (DRÖGE, 2002).

Em geral, um desbalanço que cause aumento dos níveis de EROs gera um estado fisiológico não desejável conhecido como “estresse oxidativo”. Considerando o sistema antioxidante endógeno, desbalanço nos níveis de superóxido propiciam a reação desta molécula com o óxido nítrico que é virtualmente produzido por todas as células do organismo. Esta reação dá origem à molécula de peroxinitrito ( $\text{OONO}^\cdot$ ) que é altamente reativa a moléculas lipídicas causando lipoperoxidação, principalmente das membranas celulares (Figura 5 - B). Por sua vez, o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio, que é facilmente mobilizado da mitocôndria para o citoplasma, permite a reação desta molécula com íons metálicos, principalmente o ferro, dando origem à molécula de hidroxila (Figura 5-

C). Esta ERO possui grande afinidade por macromoléculas como os ácidos nucleicos podendo causar mutações no DNA resultando em efeitos negativos no metabolismo celular incluindo desde disfunções metabólicas até a indução da carcinogênese (DRÖGE, 2002; ALFADDA E SALLAM, 2012).

Uma vez que não existem enzimas específicas que controlem efetivamente os níveis de EROs como a hidroxila, por exemplo, o organismo também conta com uma variedade de moléculas antioxidantes que possuem ação não enzimática. Algumas destas moléculas podem ser produzidas pelo próprio organismo, mas a maior parte é oriunda da dieta rica em vegetais. Estas moléculas podem agir: (1) através da inibição das reações em cadeia do peróxido de hidrogênio com o ferro e cobre; (2) reação direta com EROs reduzindo e assim inativando estes compostos; (3) auxiliar no reparo de danos causados pelas EROs e ERNs no DNA e nas membranas celulares; (4) em algumas situações podem induzir o aumento das enzimas antioxidantes potencializando assim o controle dos níveis dos radicais livres.



**Figura 5-** Potencial produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) associados a geração do estresse oxidativo. Na mitocôndria, aproximadamente 97% do oxigênio é convertido em água pela citocromo oxidase da cadeia de transporte de elétron. 1-3% do oxigênio é reduzido em ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). (A) Sistema antioxidante endógeno mostrando a ação da enzima superóxido dismutase (SOD) na dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e das enzimas catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GPX) na catalise do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. (B) Ânion superóxido em níveis não controlados permite reação desta molécula com o óxido nítrico (NO) gerando peróxinitrito (OONO<sup>-</sup>) que causa lipoperoxidação das membranas; (C) O peróxido de hidrogênio em níveis não controlados reage com metais (ferro, cobre) produzindo radical hidroxila (OH).

O estresse oxidativo crônico tem sido associado à gênese de mais de 200 tipos de doenças crônicas que afetam o ser humano (DRÖGE, 2002). Com base em informações presentes na revisão feita por Alfadda e Sallam (2012), o primeiro artigo publicado e

indexado no Pubmed sobre EROs data de 1945 sendo que até os dias atuais já foram publicados 117 mil estudos que utilizam esta denominação. A maior parte das investigações publicadas descreveu associações entre EROs com doenças tais como o câncer, resistência à insulina, diabetes mellitus, morbidades cardiovasculares, aterosclerose e envelhecimento.

Entretanto, como foi anteriormente comentado, evidências acumuladas nestas últimas décadas mostraram que as EROs não são moléculas universalmente nocivas uma vez que muitas delas servem como importantes sinalizadores de rotas metabólicas corporais. Esta condição indica que o importante é a manutenção da “regulação do metabolismo oxidoreduzidor (regulação redox)” para que a homeostase e saúde corporal sejam também mantidas.

As EROs possuem papel importante nos processos fisiológicos normais, como por exemplo, na regulação do diâmetro vascular que é influenciado pelo ânion superóxido e pelo peróxido de hidrogênio. As EROs também possuem um importante papel na defesa imunológica corporal que envolve tanto o sistema imune inato quanto o sistema adquirido. Quando o organismo é exposto a um determinado patógeno, ocorre uma explosão oxidativa nos fagócitos via produção exacerbada de EROs que é uma das primeiras linhas de defesa corporal já que estas moléculas são utilizadas para destruir os agentes invasores (DRÖGE, 2002).

O músculo esquelético é um tecido alvo na regulação oxidativa e/ou estresse oxidativo, uma vez que utiliza uma grande quantidade de energia nos processos de contração e, conseqüentemente, produz maior quantidade de EROs. Estudos recentes sugerem que as EROs podem atuar como moléculas sinalizadoras intermediárias na regulação da captação da glicose pelo músculo esquelético ainda que estes resultados tenham que ser considerados com cautela (MERRY; MCCONELL, 2012). É também recente a sugestão de que antioxidantes em excesso poderiam aumentar a suscetibilidade às neoplasias. Classicamente, as EROs em excesso estão relacionadas à promoção de diversos tipos de câncer, já que estas moléculas são altamente genotóxicas e pró-inflamatórias (PERERA; BARDEESY, 2011).

Com base nestas evidências, a ideia de que o uso farmacológico de moléculas antioxidantes simples poderiam prevenir doenças crônicas e diminuir a carga de morbimortalidade é dependente da concentração. A meta-análise feita por Bjelakovic et al (2012) não encontrou evidências que suportam o uso de suplementos antioxidantes tanto para a prevenção como para a cura de doenças. Ao contrário, o estudo mostrou que a alta ingestão de  $\beta$ -caroteno e vitamina E, assim como a ingestão de altas doses de vitamina A, poderia aumentar a mortalidade dos indivíduos.

Neste sentido, os estudos apontam para a necessidade de identificação de compostos complexos, principalmente fitoterápicos que permitam a manutenção ou reconstituição do balanço oxidativo conforme as necessidades de cada tipo de célula e em cada situação que o organismo é exposto.

Seguramente, o NO (óxido nítrico) é uma das principais moléculas reativas que precisam ser constantemente reguladas pelo organismo já que estudos mostram que níveis elevados ou baixos desta molécula estão relacionados com disfunções e morbidades crônicas (AFANAS'EV, 2009). Deste modo, a identificação de plantas com capacidade de modulação dos níveis de NO pelo organismo pode ser considerada farmacologicamente relevante.

Os estudos conduzidos por Moncada (1992, 1994) e Lancaster (1993) elucidaram o papel do NO como uma molécula fundamental na regulação de diversos processos metabólicos incluindo sua atuação como segundo mensageiro (WILLIAMS, 1996).

O NO que quimicamente também é denominado de monóxido de nitrogênio ou monóxido de azoto é um gás solúvel, lipofílico, que é sintetizado praticamente por todas as células corporais (FÖRSTERMANN E SESSA, 2012). O NO é considerado um radical livre uma vez que possui um elétron desemparelhado no seu orbital molecular de maior energia. Dificilmente forma o dímero  $N_2O_2$ . Em meio aquoso, o NO é facilmente hidrolisado originando nitratos e nitritos (CLARKE, 1993). A natureza difusiva do NO permite que ele tenha a capacidade de participar na comunicação transcelular. Assim, esta molécula é considerada um dos mais importantes sinalizadores celulares do organismo estando envolvido na dilatação do sistema vascular, na função imune, também agindo como neurotransmissor no cérebro e no sistema nervoso periférico. No sistema vascular, o NO participa na regulação de outras funções corporais incluindo o controle da homeostase (FUKUTO et al., 1993), da função plaquetária, nas interações de leucócitos com a parede dos vasos sanguíneos e na homeostase da pressão arterial sistêmica (IGNARRO et al., 1987).

Quimicamente, a síntese de NO se realiza a partir do aminoácido L-arginina que produz NO e L-citrulina na presença de oxigênio e do fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) que atuam como cofatores. Esta síntese é catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). O organismo possui três isoenzimas distintas: a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) de acordo com o tipo celular. No sistema cardiovascular o NO é uma molécula chave com múltiplos efeitos regulatórios tanto no miocárdio quanto nos vasos sanguíneos. Assim, a diminuição na produção de NO pela eNOS está associada a doenças cardiovasculares e também com outras doenças vasculares incluindo a impotência sexual

(PALMER et al., 1987; TAYLOR, 2012). Por outro lado, níveis elevados de NO principalmente produzidos via enzima iNOS na resposta inflamatória de macrófagos e por outros tipos de tecidos também têm sido associados a disfunções e a doenças (AMITAI et al., 2010).

Investigações prévias sugerem que a alteração na concentração plasmática do NO (ou aumentada ou diminuída) estaria associada a morbidades como o diabetes tipo II, a obesidade (KNOTT et al., 2010; FOLLI et al., 2011), a septicemia (BERG et al., 2011; SANTOS et al., 2012), a insuficiência renal aguda (AKSU et al., 2012), a atrofia muscular (HALL et al., 2011), a processos neurodegenerativos (JUNG et al., 2012) e a estados depressivos (SUZUKI et al., 2001). Adicionalmente, a severidade da insuficiência cardíaca ocasionada pela cardiomiopatia dilatada é afetada pelo desbalanço nos níveis de NO (WINLAW et al., 1994; SUGAMORI et al., 2002).

Estudos também sugerem que o NO possui ação bactericida. A enzima iNOS geralmente está associada a células imunes efetoras como os macrófagos que conseguem induzir a expressão destas enzimas como parte do seu repertório citotóxico, e também em neutrófilos e células natural-killers (NK) (NATHAN E HIBBS, 1991; WHEELER et al., 1997; BLESSON et al., 2002). No caso, os macrófagos do sistema imune produzem NO como um composto citotóxico utilizado para matar bactérias. Entretanto, níveis elevados de NO podem causar vasodilatação generalizada produzindo um estado hipotensivo que pode levar à morte do paciente (KATZUNG, 2006). Em concentrações elevadas o NO também atua como uma molécula pró-apoptótica uma vez que modula a expressão de proteínas relacionadas à apoptose com a Bcl-2 e a Bax (PACHER et al., 2007).

O desbalanço dos níveis de NO no organismo também tem sido associado a eventos carcinogênicos. No corpo, o NO regula diversas funções de proteínas alvo através do seu acoplamento com o ácido nitroso formando uma molécula denominada como S-nitrosotiol (SNO) através de um processo conhecido como S-nitrosilação. A S-nitrosilação parece estar associada a diversos mecanismos relacionados ao potencial papel do NO tanto na proteção contra as células cancerosas através da indução de eventos apoptóticos quanto nos processos de formação de metástases. Deste modo, segundo a revisão feita por Aranda et al., (2012), o NO pode ser terapêuticamente utilizado na reversão de células tumorais resistentes a drogas citotóxicas, já que funciona como um agente sensibilizante a quimio e radioterapia. Por outro lado, a geração de altas concentrações de NO não associadas a fisiologia normal podem induzir processos carcinogênicos (HIRST E ROBSON, 2010).



Neste sentido, a busca por compostos sintéticos ou fitoterápicos que auxiliem a modular diferencialmente o óxido nítrico celular através do sequestro do NO, quando presente em altas concentrações, são relevantes. Estes compostos podem desempenhar um papel citoprotetor agindo nos processos de toxicidade, modulando os processos inflamatórios e reduzindo o estado de estresse oxidativo cito-tecidual (IPPOUSHI, 2003, SAHA et al., 2006).

A fim de se estudar os efeitos intracelulares do NO, um número consistente de estudos utiliza o nitroprussiato sódico (NPS) como doador desta molécula incluindo investigações com extratos de plantas com propriedades fitoterapêuticas (KIM et al., 2010; INTAPAD et al., 2012; LEE et al., 2012; MUÑOZ et al., 2012).

O NPS é uma molécula conhecida há bastante tempo uma vez que foi identificada em 1850 e que a partir de 1929 passou a ser utilizada como fármaco hipotensor. O NPS, de fórmula química  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que também é denominado pentacianonitrosilferrato de sódio é um dos principais compostos doadores de NO. Esta molécula hidrossolúvel possui um complexo nitrosilado de ferro que consiste de uma molécula de ferro envolta por cinco moléculas de cianetos e um grupo nitrosilado. Por ser um composto com uma meia-vida muito curta e de dissipação rápida e imediata o NPS tem sido clinicamente utilizado como um poderoso vasodilatador para o tratamento de insuficiências cardíacas e de todas as formas de emergências hipertensivas.

Ao contrário de outros doadores de NO, o NPS funciona como um pró-fármaco que, sofre degradação NO em cianeto ( $\text{CN}^-$ ). Até pouco tempo atrás se acreditava que o NPS era uma molécula instável, entretanto estudos contemporâneos indicam que esta molécula é relativamente estável e não libera NO espontaneamente em qualquer tipo de meio. Segundo estudos conduzidos por Butler e Megson (2002), o NPS se degrada se for ativado pela luz ou na presença de algumas características tecido específica.

No organismo, após a infusão e degradação do NPS em NO e  $\text{CN}^-$ , estes produtos são rapidamente eliminados por meios não enzimáticos em interação com grupos sulfidrilas presentes nos eritrócitos e nos tecidos adjacentes. Nos eritrócitos, o cianeto reage com a metahemoglobina produzindo a cianometahemoglobina (CURRY E ARNOLD-CAPE, 1991).

O cianeto remanescente pode ser convertido em tiocianeto por reação de transulfuração que ocorre no fígado. Este processo é catalisado pela enzima mitocondrial rodanase utilizando íons tiosulfato como doadores de enxofre (KULIG, 1991). A maioria dos adultos conseguem metabolizar 50 mg de NPS. Entretanto, conforme as condições de saúde e nutrição, podem ocorrer efeitos adversos em relação ao NPS. Os radicais livres de cianeto podem, por exemplo, causar interrupção na fosforilação oxidativa por ligarem-se ao complexo

citocromo-oxidase. Esta condição gera anóxia celular, metabolismo anaeróbio e acidose láctica (ROBIN E MacCAULEY, 1992). Adicionalmente, o excesso de NO pode gerar estados de estresse oxidativo que não são desejáveis às células devido a sua alta afinidade ao superóxido e produção de peróxido (HALLIWELL, 1994).

Dadas as suas características químicas, doadores de NO, como o NPS, têm sido utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos no qual o NO é o principal alvo terapêutico (MILLER E MEGSON, 2007).

#### 1.4.2 Atividade antitumoral das plantas

A história de uso de plantas no tratamento do câncer é bastante longa e, muitos fármacos foram identificados e desenvolvidos a partir das mesmas. Entre 1983 a 1994, mais que 60% dos fármacos antitumorais aprovados nos Estados Unidos da América eram de origem natural (STÉVIGNY ET AL., 2005). O desenvolvimento de ensaios colorimétricos *in vitro* que permitem a quantificação da proliferação das culturas celulares tem permitido a identificação de um número elevado de plantas com potencial antitumoral, muitas das quais pertencem a famílias Guittiferae, Rubiaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae, entre outras (WHELAN E RYAN, 2003). Este é o caso dos alcaloides vimblastina e vincristina, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (ROUSSI et al., 2012), e do paclitaxel derivado das folhas das espécies de *Taxus* (KINGSTON, 2005). A partir do paclitaxel foram desenvolvidos os análogos sintéticos como o docetaxel e o carbazitaxel. Segundo a revisão de Crag e Newmann (2013) outros agentes quimioterapêuticos estão sendo utilizados como é o caso das moléculas semissintéticas topotecan, irinotecan e belotecan. Tais moléculas são derivadas da camptotecina isolada a partir da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*.

Entretanto, plantas medicinais, que atuam sobre doenças como o câncer, originárias do Continente Americano são menos conhecidas, apesar da grande diversidade étnico-cultural desta região do planeta. Na Família Malvaceae tem sido descrita atividade antitumoral para diversas espécies principalmente as do gênero *Hibiscus*, *Sida*, *Reevesia*, *Sterculia* (Tabela 1). Deste modo, baseado na abordagem quimiotaxonômica, de detecção de plantas com potencial farmacológico, é realístico supor que espécies do gênero *Pavonia* também possuam efeito antitumoral.

### 1.5 Estudos farmacogenéticos aplicados à análise de segurança de plantas medicinais

Para que uma substância ou um fitoterápico seja produzido ou comercializado existe a necessidade de estudos que confirmem a sua eficácia, segurança e qualidade. Isto porque, além dos benefícios terapêuticos que um dado medicamento pode proporcionar, o mesmo pode também causar efeitos indesejáveis (RANG et al., 2008). As reações adversas a medicamentos (RAM) constituem um problema importante para a saúde humana. A RAM é uma resposta prejudicial relacionada à administração de um medicamento que ocorre em doses geralmente utilizadas por seres humanos (WHO, 1972). Tais reações são causas significativas de hospitalização, aumento do tempo de permanência hospitalar e até mesmo de óbito (EINARSON, 1993). A prevalência das reações adversas está entre 1,5 a 15%, enquanto que as reações adversas graves ou fatais variam em torno de 0,4 a 2% (PESSOA et al., 2006).

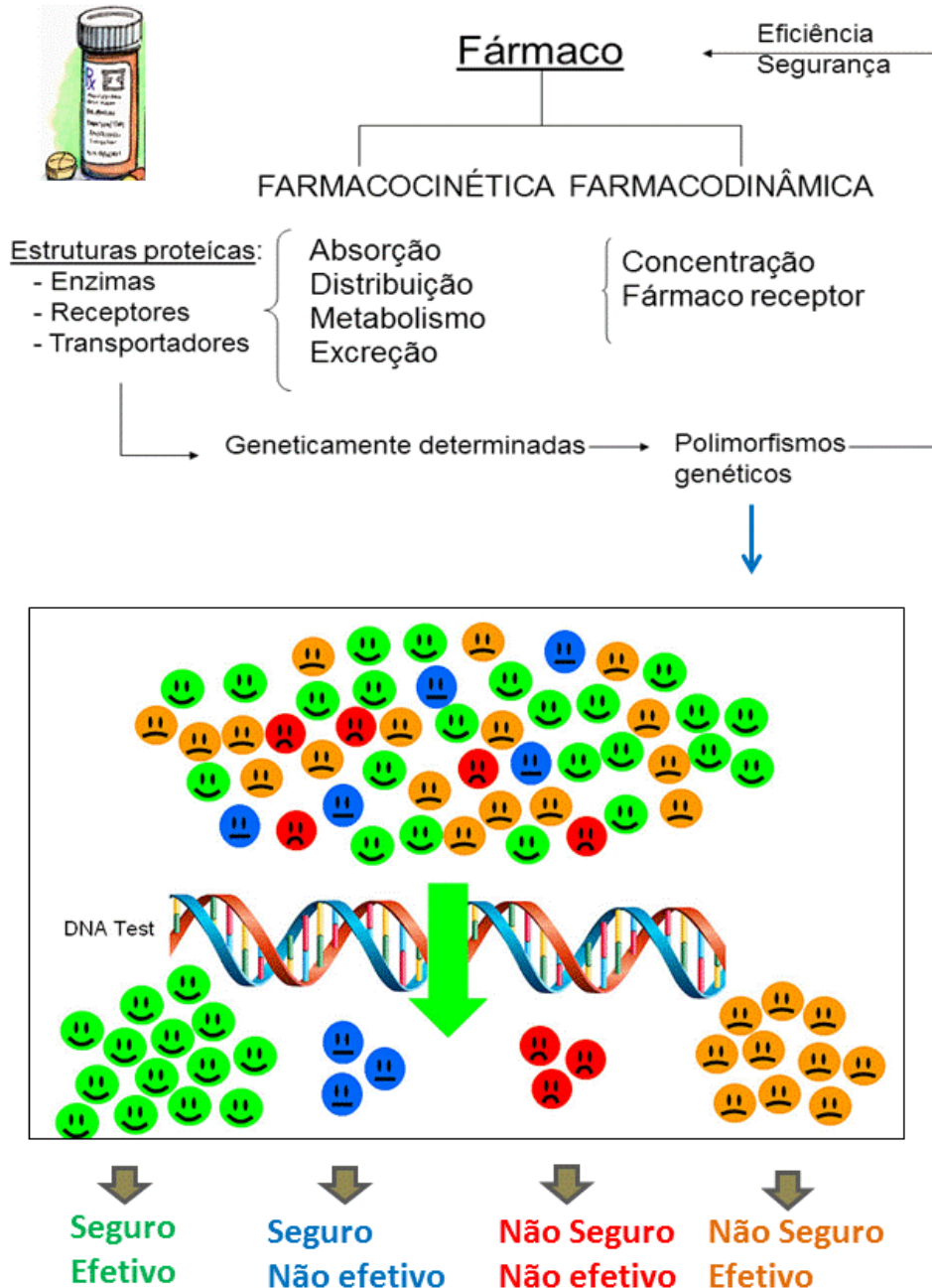
Por outro lado, muitas pessoas não conseguem obter sucesso no tratamento a partir da utilização da dose estimada para um dado medicamento. Ou seja, existe variabilidade de resposta e de susceptibilidade a toxicidade a medicamentos. As variações na resposta ao tratamento medicamentoso podem estar relacionadas a diversos fatores ambientais e genéticos. Estudos contemporâneos descreveram a relevância dos fatores genéticos na eficácia e segurança de medicamentos o que levou a emergência do conceito de farmacogenética. O número de estudos farmacogenéticos tem aumentado exponencialmente e investigações utilizando abordagens farmacogenéticas aplicadas a bioprospecção de novos fármacos e fitoterápicos também estão começando a emergir (TAUSER, 2012).

A resposta a fármacos e toxicidade são processos complexos que estão frequentemente relacionados a variações genéticas individuais, ainda que provavelmente envolvam múltiplos fatores genéticos e não genéticos.

A influência de variabilidade interindividual na resposta aos fármacos, principalmente focando variações monogênicas relacionadas a genes específicos que podem interferir no metabolismo das drogas (LIEWEI et al., 2011), é área de um novo campo da ciência: a farmacogenética. A relevância dos estudos farmacogenéticos está no potencial aumento dos benefícios clínicos e na redução de riscos associados as RAM para aquelas pessoas que não respondem as dosagens padronizadas (médias) de um determinado fármaco (WOODCOCK E LESKO, 2009).

Assim, segundo a revisão de Metzger et al., (2006) a farmacogenética é uma área da Farmacologia Clínica que objetiva otimizar o tratamento através da personalização

terapêutica, conforme as diferenças nas características genéticas dos indivíduos. Particularmente, busca identificar genes que predisponham às doenças, modulem respostas aos medicamentos, afetem a farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos e estejam associados a reações adversas à medicamentos (Figura 6).



**Figura 6-** Síntese do efeito farmacogenético de fármacos considerando a sua eficácia e segurança (modificado a partir de Metzger et al., 2006). Para a maior parte da população os fármacos são desenvolvidos com eficácia e segurança comprovada. Para alguns indivíduos este fármaco pode ser seguro, mas sem eficácia, para outros pode não ser seguro ainda que eficaz e para outros o mesmo não é nem seguro e nem eficaz.

Isto ocorre porque a maior parte dos compostos metabólicos afetados por um determinado fármaco possui origem proteica (receptores, enzimas, transportadores, etc.). Estes compostos são sintetizados no organismo a partir de genes constituídos por DNA. Por sua vez, o DNA pode apresentar variações na sua sequência nucleotídicas afetando assim a produção da proteína que é formada o que pode levar a alterações na forma e função da mesma. Quando uma variação em um dado gene ocorre em um determinado nucleotídeo (seja por substituição, adição ou deleção do mesmo) em uma determinada região do gene esta variação é denominada de mutação. Se a frequência desta mutação em uma dada população humana for igual ou maior de 1% esta variação passa a ser chamada de polimorfismos nucleotídicos simples que em Língua Inglesa é *Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs. Esta sigla é mundialmente utilizada para identificar variações genéticas simples associadas a doenças ou mesmo, a variações nas respostas a fármacos que é o que estuda a farmacogenética (SHASTRY, 2006).

Estima-se que o genoma humano possua aproximadamente 30 mil genes formados por 3,12 bilhões de nucleotídeos. A frequência de polimorfismos nestes nucleotídeos é de 1 para cada 1.250 nucleotídeos (WILLHARD, 2009). Metzger et al., (2006) comenta que “as diferenças quanto às respostas terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associadas com polimorfismos genéticos presentes em genes que afetam a farmacocinética ou a farmacodinâmica. Entretanto, outros polimorfismos também podem afetar o alvo de ação do fármaco ou fitoterápico, por exemplo se o mesmo possui atividade antioxidante ou anti-inflamatória a sua resposta pode ser afetada.

As aplicações clínicas da farmacogenética são potencialmente múltiplas. Entre estas pode ser citado seu uso no diagnóstico, prognóstico, escolha do fármaco mais adequado para o tratamento do indivíduo, utilização ou não de terapias com células-tronco, otimização da dose do fármaco, predição de RAMs, monitoramento do tratamento e também para o desenvolvimento de novas drogas incluindo análise de plantas fitoterápicas (bioprospecção) ou mesmo de compostos nutricionais (BARNES, 2003; TAUSER, 2012). Tais estudos podem envolver eficácia e segurança de compostos presentes em fitoterápicos ou mesmos extratos.

Neste sentido, pesquisas farmacogenômicas têm como objetivo individualizar as terapias a fim de maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade dos tratamentos com fármacos ou fitoterápicos. Linhagens celulares podem ser utilizadas como um modelo experimental a fim de analisar efeitos farmacogenéticos incluindo citotoxicidade ou apoptose induzida por fármacos, efeitos bioquímicos e reações enzimáticas e metabólicas. Um exemplo de estudo foi o que estimou a herdabilidade para a suscetibilidade a cisplatina em 47%

indicando que tal sensibilidade tem uma influência genética considerável (DOLAN et al., 2004).

Zang e Dolan (2009) em uma revisão sobre o uso de linhagens celulares na investigação farmacogenética comentam que a maioria dos fármacos correntemente utilizados para tratar doenças como o câncer causam RAMs. Este é o caso da cisplatina que pode causar nefro, neuro e ototoxicidade associada com o seu uso. O uso de linhagens celulares como modelo experimental podem fornecer informações rápidas, acuradas e que auxiliam estudos complementares futuros em modelos experimentais animais ou mesmo em ensaios clínicos com seres humanos.

Deste modo, análises científicas relacionadas aos potenciais efeitos tóxicos de extratos de plantas submetidos a bioprospecção ou mesmo utilizados pela população são de grande relevância (YOUNS et al., 2010). Investigações farmacogenéticas de efeitos adversos provocados por extratos de plantas ou seus principais compostos também podem ser conduzidas em seres humanos. Um exemplo é o efeito variável produzido pela cafeína na resposta cardiovascular. Um estudo recente conduzido por Renda et al., (2012) em 110 homens saudáveis que bebem café moderadamente mostrou que a pressão sistólica na presença da ingestão de café era afetada por genes dos receptores da adenosina (A2A) e  $\alpha$ 2-adrenérgicos.

### 1.5.1 O polimorfismo genético Ala16Val da enzima Superóxido Dismutase dependente de Manganês (SOD2)

Como foi anteriormente comentado, o organismo possui dois sistemas de defesa antioxidante: um endógeno e outro exógeno. No sistema exógeno a enzima superóxido dismutase tem papel destacado já que dismuta o íon superóxido em peróxido de hidrogênio. Esta enzima possui três isoformas, sendo duas cobre/zinco dependentes (SOD1 e SOD3) e uma manganês dependente (SOD2). Apesar das três enzimas serem sintetizadas a partir de genes nucleares, as primeiras atuam no citoplasma e região extracelular, respectivamente enquanto que a SOD2 atua em nível mitocondrial. Entretanto, diversos estudos têm mostrado que a expressão da SOD2 é essencial para a sobrevivência da vida aeróbia (HOLLEY et al., 2012).

Um estado redox celular anormal causado pela insuficiência SOD2 também tem sido associado com muitos tipos de doenças (MIAO et al., 2009). O papel fisiológico da enzima SOD2, como citoprotetor, foi claramente estabelecido a partir de estudos em camundongos, geneticamente modificados, que não possuíam o gene da SOD2 (*Knockout* para o gene da SOD2) os quais morrem logo após o nascimento. Estes camundongos apresentam alterações morfofuncionais importantes incluindo cardiomiopatia dilatada e neurodegeneração (LI et al., 1995).

Investigações epidemiológicas e experimentais também sugerem que alterações na eficiência da SOD2 estão relacionadas com neoplasias (St CLAIR et al., 1997). Embora as razões precisas destes fenômenos entre crescimento tumoral e atividade intracelular da SOD ainda não sejam conhecidas, tais achados corroboram a ideia de que a expressão da SOD influencia à carcinogênese. Desse modo, muitos autores acreditam que o gene da SOD, especialmente o da SOD2, poderia ser considerado um gene de supressão tumoral. (OBERLEY E OBERLEY, 1984). Por este motivo Huang et al., (2000) sugerem que a SOD pode ser um alvo seletivo promissor para a morte de células cancerosas.

Um polimorfismo genético no gene da SOD2 em que uma alanina é substituída por uma valina na posição 16 da região protéica responsável pelo transporte da proteína SOD2 do citosol (onde foi sintetizada) para dentro da mitocôndria (Ala16Val-SOD2) foi investigado e tem sido foco de diversas investigações epidemiológicas. Isto porque, o alelo V (valina) da SOD2 dá origem a uma proteína com uma estrutura beta-lâmina que fica parcialmente presa na membrana mitocondrial e que também diminui a eficiência da enzima quando comparada a proteína produzida a partir do alelo A (alanina). Seres humanos podem ser portadores de três possíveis genótipos: AA, AV e VV. O impacto deste polimorfismo sobre diversos aspectos da saúde humana foi recentemente revisado por Bresciani et al., (2013).

Investigações *in vitro* usando um precursor Ala SOD2 gerou homotetrameros MnSOD com 30-40% mais ativos do que a matriz processada com precursor Val MnSOD. A Ala-MTS permite transportar com eficiência a SOD2 na matriz mitocondrial, enquanto que a variante Val causa parada parcial do precursor dentro da membrana mitocondrial interna e diminuição da formação do homotetramero MnSOD ativa na matriz mitocondrial (SUTTON et al., 2003). Portanto, a variante do alelo Val produz uma mudança conformacional na estrutura da folha beta-secundária de uma proteína que pode diminuir a eficiência do transporte dentro da mitocôndria.

Um estudo conduzido por Taufer et al., (2005) sugeriu que apesar do polimorfismo Ala16Val-SOD2 não afetar a longevidade das pessoas o mesmo afetava diversos aspectos

relacionados ao envelhecimento e suscetibilidade a doenças como o câncer de próstata e mama.

Apesar do genótipo AA apresentar uma enzima mais eficiente, estudos tanto de pesquisadores que participam deste projeto quanto de outros grupos de pesquisa têm associado ao mesmo um maior risco de câncer. Vários estudos têm sugerido que o polimorfismo Ala16Val SOD2 está associado com diferentes patologias dependentes do estresse oxidativo. No entanto, às vezes o risco de associação está relacionada ao alelo A/genótipo AA como câncer de próstata (TAUFER et al., 2005; IGUCHI et al., 2009; ZEJNILOVIC et al., 2009; MAO et al., 2010), da mama (COX et al., 2006; ERAS-ERDOGAN et al., 2009; BICA et al., 2010), pulmão, estômago (ZEJNILOVIC et al., 2009).

Por outro lado, estudos realizados por Gottlieb et al. (2005), Montano et al., (2009, 2012), Duarte et al., (2010) e Manica-Cattani et al., (2012) observaram que o genótipo VV está relacionado a níveis maiores de LDL-oxidado, maior resposta pró-inflamatória, e a maior risco de obesidade e hipercolesterolemia, respectivamente.

Muitos destes resultados subsidiaram Montagner et al (2010) a estabelecer um modelo experimental *in vitro* que utiliza cultura primária de linfócitos oriundos de sujeitos portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 para estudos farmacogenéticos. Análise adicional *in vitro* realizada em cultura primária de linfócito mostrou que o genótipo VV, que é mais suscetível a obesidade produz maior quantidade de citocinas inflamatórias do que os demais genótipos. Deste modo este polimorfismo passou a ser utilizado como modelo experimental para estudos de fármacos sintéticos e extratos de plantas com potencial farmacológico. Uma investigação recente conduzida por Costa et al., (2012) mostrou influencia no efeito antioxidante do fármaco citrato de clomifeno que é utilizado farmacologicamente na indução da ovulação tanto para investigações sobre as condições reprodutivas de mulheres com dificuldade de engravidar quanto no tratamento do ovário policístico.

## **1.6 Efeito da enzima SOD2 na biologia do eritrócito**

Apesar do polimorfismo Ala16Val-SOD2 ser um modelo experimental *in vitro* que pode ser utilizado na bioprospecção da eficácia e segurança de extratos de plantas fitoterápicas ou mesmo de fármacos sintéticos, a principal limitação do modelo diz respeito ao



baixo número de células mononucleares (linfócitos especialmente) para a realização de testes com um número consistente de concentrações ou mesmo de diferentes tipos de extratos.

Por outro lado, a oxidação de eritrócitos tem sido extensivamente estudada como um modelo de estresse oxidativo de biomembranas (CHIU et al., 1982). Isto porque, na presença de níveis elevados de superóxido este tende a reagir com outro radical livre importante produzido virtualmente por todas as células o NO formando uma importante molécula o ONOO. O peróxido nitrito é considerado como uma ERN que é altamente reativa as moléculas lipídicas presentes na membrana que são oxidadas causando extensivos danos as células. Por outro lado, tem sido demonstrado que EROs atacam as membranas dos eritrócitos e induzem a oxidação de lipídios e proteínas, eventualmente causando hemólise. Esta hemólise, por sua vez pode ser suprimida na presença de agentes antioxidantes como as vitaminas C e E (YAMAMOTO et al., 1986; SANDHU et al., 1992). Estudos também mostraram que a acetilcisteína, a glutathione e a albumina tem capacidade de inibir eficientemente a hemólise (KONDO et al., 1997).

Porém, como é sabido, eritrócitos humanos não possuem núcleo e nem mitocôndria e, portanto, teoricamente a influencia da SOD2 nestas células seria mínima. Ao contrário do que poderia ser pensada esta ideia não é confirmada por evidências científicas.

Deficiência da SOD2 tem sido associada a outras alterações fisiológicas incluindo o sistema hematopoiético. Os eritrócitos são células que apresentam um sistema antioxidante de alta eficiência se comparados a outras células do organismo. Estudos têm sugerido que a capacidade antioxidante eritrocitária diminui em presença da anemia ferropriva (ACHARYA et al., 1991). No caso os níveis de SOD são mais baixos em indivíduos anêmico sendo este quadro revertido com o tratamento apropriado (ISLER et al., 2002).

Entretanto, seria esperado que deficiências em enzimas antioxidantes com atividade citosólica como a SOD1 e a catalase seriam as enzimas diretamente afetadas pela hemoglobinopatias uma vez que eritrócitos maduros não possuem núcleo nem organelas, e, portanto são incapazes de sintetizar novas proteínas. De fato, a deficiência da SOD1 parece estar associada a desordens hematológicas que levam a quadros como a anemia hemolítica, como demonstrado em estudos com camundongos geneticamente modificados que não possuem o gene da SOD1 (IUCHI et al., 2007).

Porém, foi sugerido que a eficiência da SOD2 afeta a qualidade do eritrócito produzido. A fim de verificar efeitos potencialmente relacionados com a ausência da atividade enzimática da SOD2, Friedman e colaboradores (2004) criaram um modelo experimental de quimeras hematopoiéticas. Neste modelo, todas as células vermelhas do sangue (hemácias)

eram derivadas de células-tronco do fígado fetal de camundongos *knockout* para o gene da SOD2. Estes autores observaram que os animais que receberam células SOD2<sup>(-/-)</sup> permaneceram persistentemente anêmicos, com indicações sugestivas de processo hemolítico. Estudo adicional, do mesmo grupo de pesquisa, mostrou que a deficiência de SOD2 também estava associada com maior dano oxidativo nas células vermelhas. A deficiência da SOD2 resultou em dano oxidativo de proteínas das células progenitoras eritróides. Estes danos levaram a alterações na propriedade de deformação da membrana das hemácias e diminuição na sobrevivência celular. Além disso, foi observado que essas hemácias deficientes em SOD2 apresentavam morfologia semelhante à encontrada em anemias sideroblásticas que ocorrem em seres humanos (FRIEDMAN et al.,2004).

A anemia sideroblástica (SA) representa um grupo de desordens heterogêneas que possuem como característica comum, além de anemia, a presença de depósitos de ferro nas mitocôndrias dos eritroblastos. A mitocôndria “carregada” de ferro assume localização perinuclear nas células vermelhas jovens que estão ainda em processo de amadurecimento. Por este motivo, tais células recebem o nome de Sideroblastos em Anel.

A fisiopatologia das anemias sideroblásticas tem por base um distúrbio da síntese do heme por outras causas que não a carência de ferro. Uma vez que o heme é formado pela incorporação do ferro à proteína protoporfirina, esse processo, desde a síntese de protoporfirina até a incorporação do ferro acontece no interior dos eritroblastos (ALCINDOR, 2002).

Evidências sugerem que a SA ocorre a partir de uma perturbação na interface entre a função mitocondrial e o metabolismo do ferro. Este processo anormal é o que leva a uma deposição excessiva de ferro na mitocôndria dos glóbulos vermelhos que estão em desenvolvimento. O ferro mitocondrial acumulado é muito prejudicial ao eritroblasto o que, eventualmente pode levar a sua destruição ainda dentro da medula. Este processo é conhecido como eritropoiése ineficaz (ALCINDOR, 2002).

Entretanto, estudos adicionais sugerem que a eficiência da SOD2 tem um papel relevante na SA (MARTIN et al., 2006). Um estudo recente com camundongos irradiados e reconstituídos com células hematopoéticas com falta de SOD2 mostrou uma anemia hemolítica persistente e, em eritroblastos deficiente, o estresse oxidativo mitocondrial reduziu a expressão de vários genes que codificam componentes nucleares da cadeia respiratória, ciclo de Krebs e da síntese protéica mitocondrial (MARTIN et al.,2011).

Assim, a análise da potencial influência do polimorfismo Ala16Val-SOD2 na qualidade eritrocitária poderia servir para a construção de modelo experimental *in vitro*

similar ao descrito por Montagner et al., (2010) utilizado na investigação da potencial influencia genética no efeito antioxidante de extratos e frações de plantas como da espécie *Pavonia xanthogloea*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar compostos bioativos presentes no extrato e frações de *Pavonia xanthogloea* avaliando a sua ação antioxidante, antitumoral e também o potencial efeito citotóxico via estudos farmacogenéticos em hemácias humanas portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar e quantificar compostos polifenólicos, taninos e flavonóides com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em seis diferentes extratos de folhas da *Pavonia xanthogloea*
- A partir de estudos com modelos experimentais *in vitro* com extrato e frações de *Pavonia xanthogloea*:
  - Determinar o efeito antioxidante em células mononucleares do sangue periférico expostas a altas concentrações de NO;
  - Determinar se o polimorfismo Ala16Val-SOD2 possui influencia na qualidade de eritrócitos expostos a estresse oxidativo e seu potencial uso como ensaio farmacogenético *in vitro* aplicado a bioprospecção de fármacos sintéticos e fitoterápicos;
  - Avaliar o efeito antitumoral em linhagens de câncer de próstata e o potencial efeito citotóxico farmacogeneticamente influenciado pelo polimorfismo Ala16Val-SOD2.



### 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo foram organizados sob a forma de três manuscritos descritos abaixo:

#### 1º Manuscrito

#### **THE *Pavonia xanthogloea* (EKMAN, MALVACEAE): PHENOLIC COMPOUNDS QUANTIFICATION, ANTIOXIDANT AND CITOTOXIC EFFECT ON HUMAN LYMPHOCYTES CELLS**

**Autores:** Clarice Pinheiro Mostardeiro, Marco Aurélio Mostardeiro, Ademir Farias Morel, Raul Moreira Oliveira, Alencar Kolinski Machado, Pauline Ledur, Francine Carla Cadoná, Ubiratan Flores da Silva, Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Revista:** Aceito para a publicação na revista Pharmacognosy Magazine

#### 2º Manuscrito

#### **THE HUMAN ALA16VAL SOD2 POLYMORPHISM INFLUENCE ERYTHROCYTE HEMOLYSIS EXPOSED TO A PROTEIN KINASE C INHIBITOR**

**Autores:** Clarice Pinheiro Mostardeiro, Ademir Farias Morel, Marco Aurélio Mostardeiro, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Tiago Duarte, Etiane Tatsch, Rafael Noal Moresco, Cristina da Costa Krewer, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Francine Carla Cadoná, Maria Fernanda Mânica-Cattan<sup>g</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** Cell Biology and Toxicology.

#### 3º Manuscrito

#### **EFFECT OF *PAVONIA XANTHOGLOEA* (EKMAN, MALVACEAE) EXTRACT AND FRACTIONS ON PROSTATE CANCER CELL LINE AND HUMAN ERYTHROCYTES WITH DIFFERENT ALA16VAL-SOD2 GENE POLYMORPHISM**

**Autores:** Clarice Pinheiro Mostardeiro, Marco Aurélio Mostardeiro, Ademir Farias Morel, Raul de Oliveira, Alencar Kolinski Machado, Francine Carla Cadoná, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Tális De Oliveira Silva, Pauline Ledur, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** Journal Ethnopharmacology





### 3.1. Manuscrito 1

#### **THE *Pavonia xanthogloea* (EKMAN, MALVACEAE): PHENOLIC COMPOUNDS QUANTIFICATION, ANTIOXIDANT AND CITOTOXIC EFFECT ON HUMAN LYMPHOCYTES CELLS**

Clarice Pinheiro Mostardeiro<sup>1</sup>, Marco Aurélio Mostardeiro<sup>2</sup>, Ademir Farias Morel<sup>3</sup>, Raul Moreira Oliveira<sup>4</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>1</sup>, Pauline Ledur<sup>5</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>1</sup>, Ubiratan Flores da Silva<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,4,5,\*</sup>

#### **Affiliation**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Sergipe

<sup>3</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>5</sup> Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

#### **Correspondence**

Profa Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Address: Av Roraima 1000, Prédio 19, Laboratório de Biogenômica-UFSM, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-32208736 Fax: 55-55-32208239, Email: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

**Sponsors of the research:** Brazilian Research Agencies: CNPq (n° 300969/2009-0 and 471233/2007-2), FAPERGS (n° 10/0029-0), CAPES and FAPEAM.

**ABSTRACT**

Introduction: *P. xanthogloea* is traditionally used as an antimicrobial and anti-tumour medicine in Southern Brazilian region. However, investigations about this species are still incipient. Hypothesis tested: the study postulated that *P. xanthogloea* specie present some phenolic compound and present some biological properties as antioxidant and cytoprotective effect against oxidative stress. Methods: the content of eight phenolic molecules in the crude ethanolic extract of the aerial part of *P. xanthogloea* and its five fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, and water) was determined by HPLC method. The antioxidant capacity of the extract and the fractions was determined by DPPH assay. The potential antioxidant and cytoprotective effect was also analysed in human lymphocyte culture treated with extract/fractions at different concentrations with and without oxidative stress generated by hydrogen peroxide and sodium nitroprusside (SNP) exposition. Results: Tiliroside was the molecule detected in all extract. Water and ethyl acetate fractions showed the highest radical-scavenging activity. The crude extract, hexane, water, and n-butanol reversed the higher ROS levels generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SNP to levels similar to those observed in the control group. In addition, crude extract, hexane, ethyl-acetate and n-butanol did not caused cytotoxicity whereas water fraction was cytotoxic at higher concentration tested here (300 µg/mL). The cytotoxicity reversion caused by SNP exposition was concentration-dependent of the extract and fractions. However, dichloromethane fraction increased cell mortality in all concentrations investigated and was not able to decrease cell death in the lymphocytes exposed to SNP. Conclusion: the results suggest potential medicine use of this species.

**KEY WORDS:** *Pavonia*, antioxidant, oxidative stress, nitric oxide, hydrogen peroxide, sodium nitroprusside

## INTRODUCTION

*Pavonia* constitutes the largest genus of flowering plants in the mallow family, Malvaceae, which is represented by over 250 species, with 134 occurring in Brazil [1]. Several species are used in traditional medicine in several countries including India, Tanzania, and Brazil. Some traditional applications of *Pavonia* include the treatment of gastrointestinal problems such as dysentery and gut haemorrhage, antimicrobial applications, and treatment of cancer [2,3,4]. Previous studies of the biological activity of *Pavonia* species, described antimicrobial and larvicidal effect [2,4,5], antispasmodic activity [3], anti-hypertensive and anti-diabetic properties [6,7], analgesic, and anti-inflammatory effects [8], as well as hepatoprotective and anti-oxidant properties [9].

However, studies of the bioactive properties of *Pavonia* species used in popular medicine in southern Brazilian region are still incipient such as *P. xanthogloea* popularly known as 'erva-de-ovelha' (herb sheep). Traditionally, this specie is used as antimicrobial and anti-tumour medicines. However, scientific evidences for existence of chemical molecules that presented these properties biological properties [10,11,12] have not yet been reported.

Therefore, in the present study, the presence and the concentration of eight phenolic molecules were determined in the crude extract and five fractions of the aerial parts of *P. xanthogloea*. Their antioxidant effect of all extract/fractions was determined. In the cell assay, the cytoprotective effect of plant extract/fractions was evaluated by the capacity to reverse toxic effects produced in human lymphocytes exposition to sodium nitroprusside (SNP), a prooxidant molecule that produce high levels of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nitric oxide (NO) [13].

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals.

All chemicals used in this study were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, USA.), Invitrogen (USA), or Cultilab Co. (São Paulo, Brazil), unless otherwise stated.

### *P. xanthogloea* material.

Samples of this species were collected from the Caçapava do Sul municipality in the Pampa biome, located in the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul. The Brazilian Pampa lies within the South Temperate Zone where grasslands scattered with shrubs and trees are the dominant vegetation [22]. The species was identified by a botanical specialist and a sample of the collected material is archived as voucher specimen number SMDB 13.744 at the Herbarium of Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

### ***P. xanthogloea* extract and fraction preparations.**

The aerial parts of *P. xanthogloea* (900 g) were initially macerated with ethanol (EtOH) (5 × 1 L) and maintained at room temperature over a period of 48 h. The ethanolic extract was filtered and vacuum evaporated to dryness to obtain a crude extract (120 g). The crude extract (100 g) was suspended in water and repeatedly fractionated with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and n-butanol by using a separator funnel. The remaining water is the fractionation of aqueous fraction. The fractions were centrifuged and filtered. The solvents were removed using a rotary evaporator under reduced pressure. The fractions were then lyophilized and stored at -20°C until analysed.

### **HPLC analysis**

HPLC analysis was performed on Agilent 1200 liquid chromatograph system (Agilent technologies, CA, USA) consisting of binary pump, an auto-sampler and diode-array detector. The mobile phase was A (Formic acid 0.1%) and B (CH<sub>3</sub>CN) at a flow rate of 1.0 mL/min following a linear gradient: 0-7 min (85% A), 7-30 min (50% A), 30-40 min (100% B) over 50 min. A reversed-phase analytical Zorbax Eclipse C18 column (250 mm×4.6 mm× 5 µm; Agilent technologies) was used at 25°C temperature. The calibration curve and detection wavelength for the molecules analyzed were: gallic acid  $y = 65.629 x + 95.158$  ( $r = 0.9998$ ); catechin,  $y = 14.651 x - 6.6277$  ( $r = 0.9999$ ) at 278 nm; chlorogenic acid,  $y = 66.768 x - 147.92$  ( $r = 0.9994$ ); caffeic acid,  $y = 128.33 x + 259.86$  ( $r = 0.9996$ ) at 314 nm; rutin,  $y = 40.667 x + 91.863$  ( $r = 0.9994$ ); quercitrin,  $y = 21.321 x + 24.133$  ( $r = 0.9998$ ) at 356 nm; quercetin,  $y = 94.731 x + 111.49$  ( $r = 0.9996$ ), tiliroside,  $y = 34.755 x + 62.671$  ( $r = 0.9994$ ) and Kaempferol,  $y = 82.757 x - 150.75$  ( $r = 0.9997$ ) at 366 nm. The injection volume was 20 µL.

### **Antioxidant capacity measurements**

The antioxidant capacity of *P. xanthogloea* extract and their fractions was evaluated by a 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) assay comparing samples with three pure antioxidant molecules (ascorbic acid, rutin, and gallic acid) according to a previously published method [24]. All tests were performed in triplicate. The antioxidant capacities were described in terms of IC<sub>50</sub> (concentration of sample required to scavenge 50% of the DPPH free radicals). The extract concentrations used in each reaction to calculate the IC<sub>50</sub> were 1, 3, 10, 30, 100, 300, and 1000 µg/mL.

### **Redox effect of *P. xanthogloea* extract/fractions**

To test if *P. xanthogloea* was able to modulate redox states in human lymphocytes, cells were treated with extracts/fractions with or without concomitant exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) and SNP (5 µM). The SNP is used to generate NO over the course of 5 h. Both molecules (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO) are known to play a key role in many cellular processes, but at high levels can cause cellular redox imbalance [25], resulting in oxidative stress.

The analyses were performed using lymphocytes from 3 to 4 healthy human donors, obtained from peripheral blood samples collected by venipuncture after overnight fasting for 12 h as previously described in Bittencourt et al. and Montagner et al. [11, 26]. Blood specimens (5 mL) were routinely centrifuged for 15 min at 2500 rpm within 1 h of collection, and lymphocytes were transferred to solutions containing different concentrations of *P. xanthogloea* extract/fractions with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SNP dissolved in RPMI 1640 culture medium. The cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere over a period of 5 h. Thereafter, ROS levels were evaluated using the cell membrane permeable fluorescent compound, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). ROS levels were evaluated after 5 h of SNP exposure in 20 µL samples of cells treated with DCFH-DA (10 mmol/L) for 60 min at 37°C. The fluorescence was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm [27].

Similar experiments were performed to evaluate the effect of *P. xanthogloea* extracts on lymphocyte viability with or without 5 h of SNP exposure. Cell viability was determined by measuring lactate dehydrogenase activity (LDH). The LDH analysis was performed using a kit (Labtest Co., São Paulo, Brazil) following the manufacture instructions [28]. The enzyme activity was read at 340 nm by using a spectrophotometer. To analyse the ROS levels and LDH activity data, the absorbance values obtained for all treatments were calculated as a percent of those obtained for the untreated control group by using the follow equation:

[(absorbance of sample treatment/absorbance of untreated sample)  $\times$  100]. Each treatment was analysed in triplicate.

### Statistical analysis

Data are presented as means and standard errors of the means ( $\pm$ SE). The antioxidant effect of *P. xanthogloea* crude extracts and their 5 fractions were compared using one-way analysis of variance followed by Dunnet and/or Tukey *post hoc* tests. All statistical analyses were performed, where all p values were two-tailed, and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

The chemical compounds present in the *P. xanthogloea* crude extract and its fractions is shown in **Table 1**. Tiliroside was detected in all extract/fractions of *P. xanthogloea*, and ethyl acetate and water fractions presented highest content of this molecule [**Figures 1 and 2**]. Gallic and chlorogenic acid were quantified in crude extract and ethyl acetate [Figure 1A], n-butanol [Figure 2D] and water [Figure 2E] fractions whereas quercitrin was quantified just in n-butanol [Figure 2D] fraction. On the other hand, catechin, rutin, quercetin, caffeic acid and kaempferol were not detected or detected in very low concentrations in the *P. xanthogloea* crude extract and fractions analysed here.

**Table 1:** Chemical composition of *Pavonia xanthogloea* from crude extract and fractions.

Compounds	<i>Pavonia xanthogloea</i>					
	Ethanol Crude extract	Fractions				
		Hexane	Dichloro- methane	Ethyl acetate	n-Butanol	Water
mg/g $\pm$ SD	mg/g $\pm$ SD	mg/g $\pm$ SD	mg/g $\pm$ SD	mg/g $\pm$ SD	mg/g $\pm$ SD	
Gallic acid	2.1 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	d	d	1.8 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	2.7 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
Catechin	d	nd	nd	nd	nd	nd
Chlorogenic acid	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	nd	nd	6.4 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Caffeic acid	d	nd	nd	d	d	d
Rutin	nd	nd	d	nd	nd	nd
Quercitrin	nd	nd	nd	nd	11.1 $\pm$ 0.05	d
Quercetin	nd	nd	d	n	n	n
Tiliroside	3.0 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.4 $\pm$ 0.04 <sup>e</sup>	0.2 $\pm$ 0.05 <sup>f</sup>	81.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	55.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three determinations. Averages followed by different letters in each column differ by Tukey test at  $p < 0.005$ . d, detected

The *P. xanthogloea* antioxidant capacity was assessed in on the basis of DPPH reduction after 30 min [Figure 3]. As expected, varying antioxidant capacity was observed in the *P. xanthogloea* extract/fractions. Both the water ( $IC_{50} = 43.4 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ ) and ethyl acetate ( $IC_{50} = 55.8 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$ ) fractions showed higher radical-scavenging activity than did n-butanol ( $IC_{50} = 72.8 \mu\text{g/mL}$ ), dichloromethane extract ( $IC_{50} = 158.9 \mu\text{g/mL}$ ), and crude extract ( $IC_{50} = 241.6 \pm 16.1 \mu\text{g/mL}$ ).

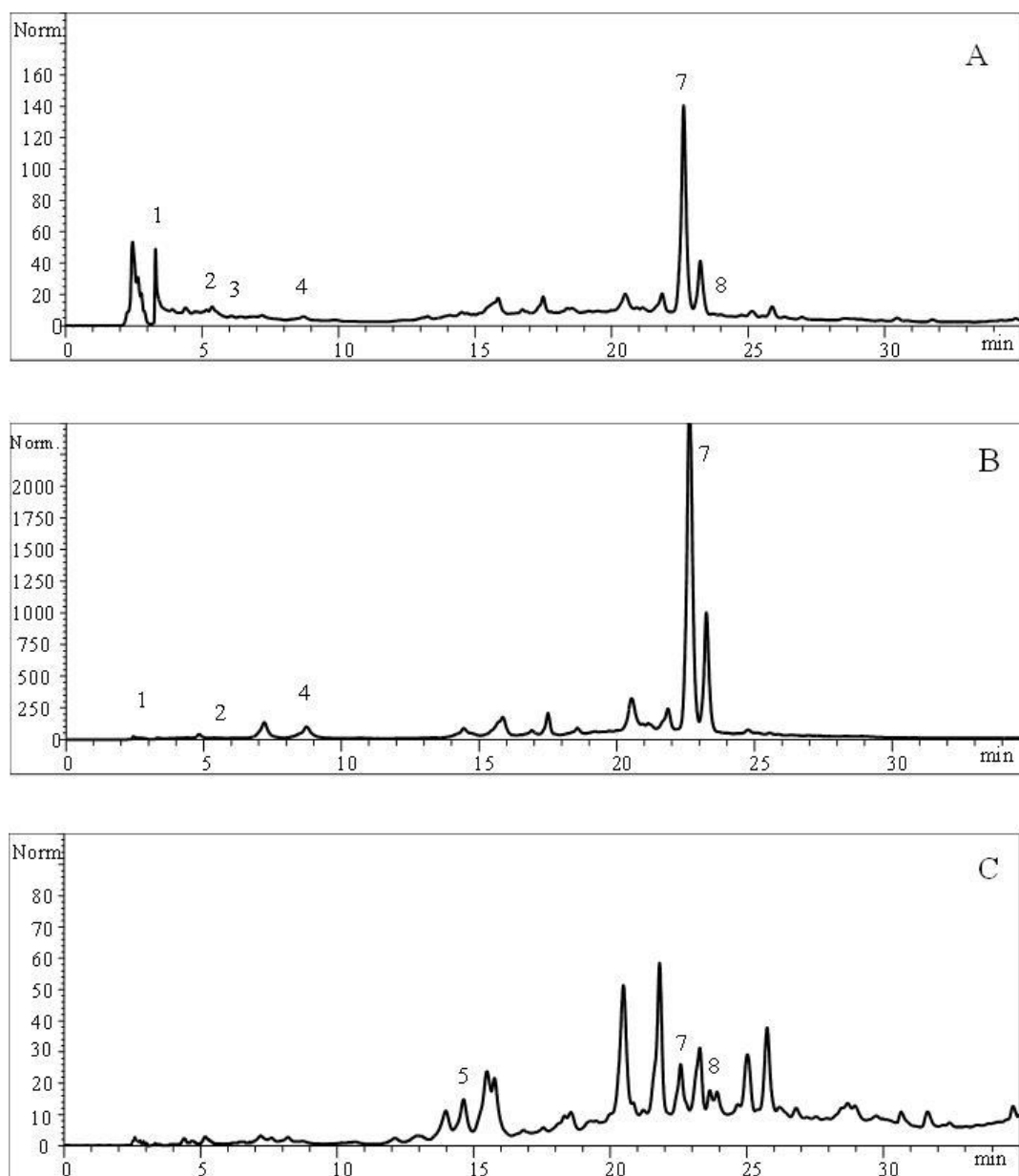


Figure 1: High performance liquid chromatography profile of *Pavonia xantholegea*, crude extract (A), ethyl acetate (B) and dichloromethane (C) at a concentration of 8 mg/mL, detection UV was at 314 nm. Gallic acid (peak 1,  $t_r=3.34$ ), caffeic acid (peak 2,  $t_r=5.36$ ), catechin (peak 3,  $t_r=6.07$ ), chlorogenic acid (peak 4,  $t_r=8.71$ ), rutin (peak 5,  $t_r=14.69$ ), quercitrin (peak 6,  $t_r=17.69$ ), tilirosin (peak 7,  $t_r=22.64$ ), quercetin (peak 8,  $t_r=23.74$ ).



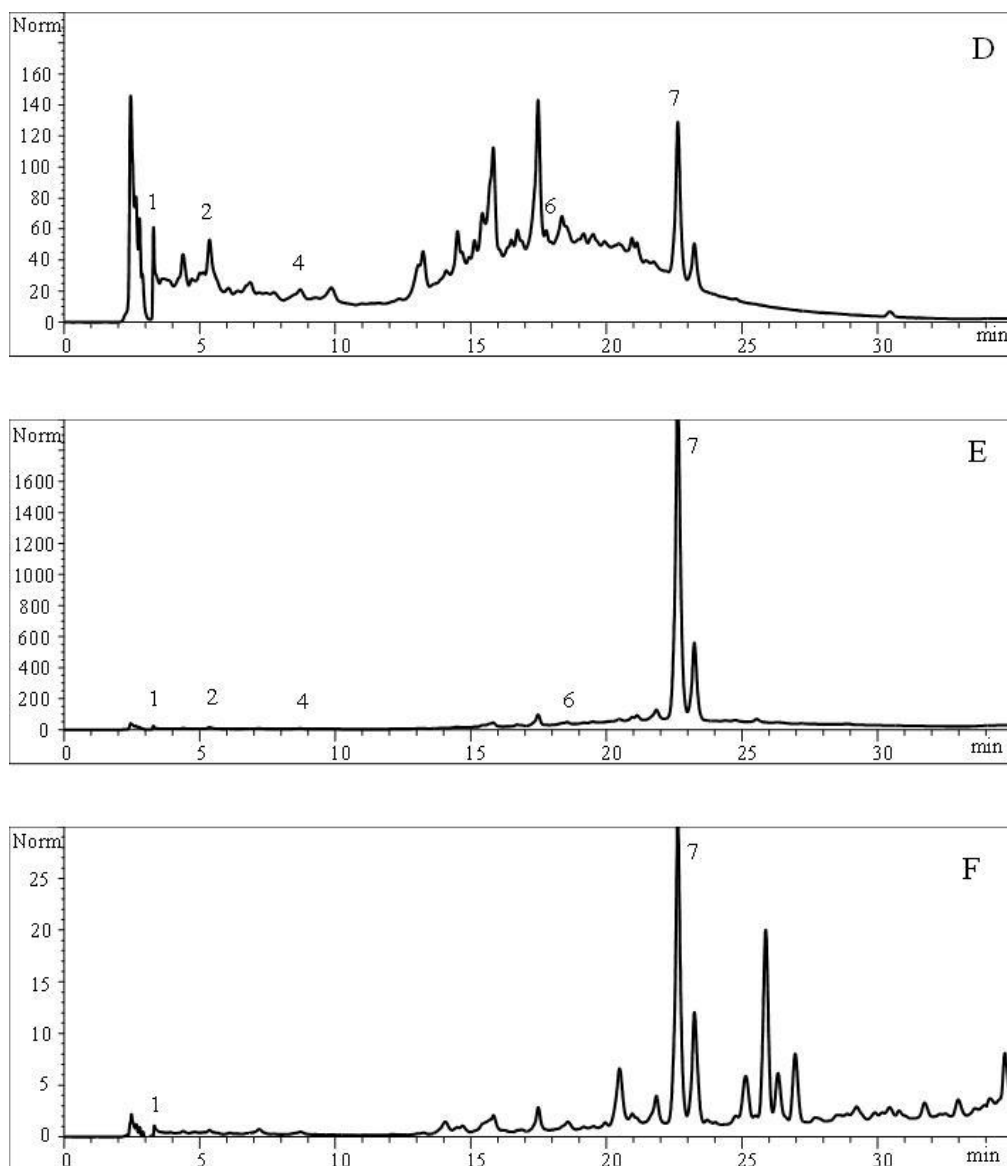


Figure 2: High performance liquid chromatography profile of *Pavonia xantholegea*, n-butanol (D), water (E) and hexane (F) at concentration 8mg/mL, detection UV was at 314nm. Gallic acid (peak 1,  $t_r=3.34$ ), caffeic acid (peak 2,  $t_r=5.36$ ), catechin (peak 3,  $t_r=6.07$ ), chlorogenic acid (peak 4,  $t_r=8.71$ ), rutin (peak 5,  $t_r=14.69$ ), quercitrine (peak 6,  $t_r=17.69$ ), tiliroside (peak 7,  $t_r=22.64$ ), quercetin (peak 8,  $t_r=23.74$ ).

The hexane extract showed a lower DPPH reducing activity ( $IC_{50} = 857.9 \pm 11.6 \mu\text{g/mL}$ ) when compared to other fractions. The antioxidant capacity of positive controls ( $IC_{50}$

values) was  $5.7 \pm 0.2$ ,  $2.6 \pm 0.2$ , and  $16.1 \pm 0.1$   $\mu\text{g/mL}$  for ascorbic acid, gallic acid, and rutin, respectively.

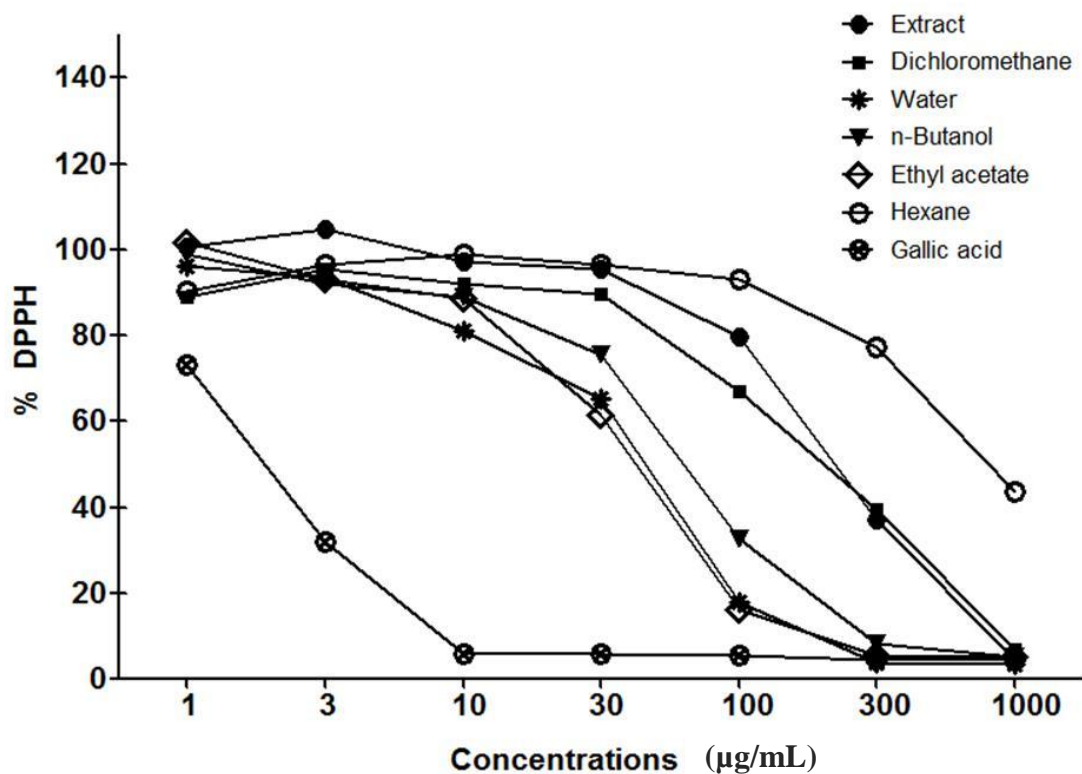


Figure 3: Antioxidant capacity of *Pavonia xanthogloea* crude extract and five fractions evaluated by DPPH assay. Gallic acid was used as reference of antioxidant molecule.

The **Figure 4** shows the lymphocyte ROS levels after 5 h of *P. xanthogloea* treatment with or without exposure to SNP and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , two important pro-oxidant molecules. In general, lymphocytes exposed to only crude *P. xanthogloea* extract, water, n-butanol and hexane at 50 or 100  $\mu\text{g/mL}$  did not alter ROS levels when compared to the untreated control group.

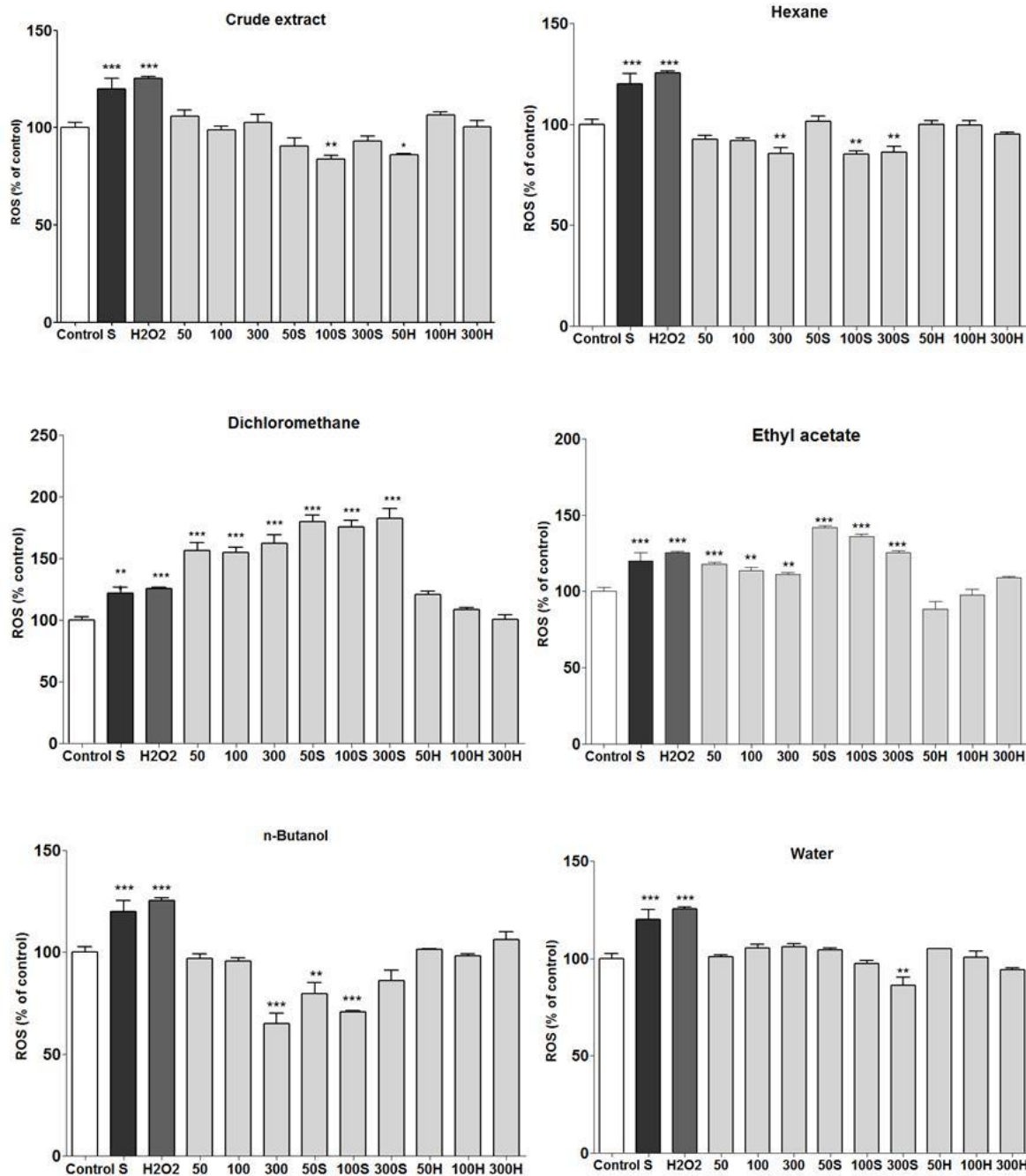


Figure 4: Effect on human lymphocytes reactive oxygen species (ROS) production of *P. xanthogloea* extract/fractions ( $\mu\text{g/mL}$ ) with and without sodium nitroprusside (S) exposition a prooxidant molecule that generates higher nitric oxide (NO) levels. The different concentrations of each extract/fractions were statistically compared by oneway analysis of variance followed by Dunnet *post hoc* test. \* p  $\leq$  0.05; \*\* p  $\leq$  0.01; \*\*\* p  $\leq$  0.001.

Treatments with hexane and n-butanol at 300  $\mu\text{g/mL}$  resulted in lower ROS concentrations than the control group indicating an antioxidant effect. On the other hand, all

concentrations of the dichloromethane and ethyl acetate fractions significantly increased ROS levels when compared to the control group, indicating oxidative stress.

As expected, lymphocytes exposed to only SNP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed a ROS concentration approximately 25% higher than that in the untreated cells. The antioxidant effect of *P. xanthogloea* in the lymphocytes exposed to SNP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was dependent each extract/fraction and their concentrations. When lymphocytes were exposed to SNP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the crude extract, hexane, water, and n-butanol reversed the ROS levels to levels similar to those observed in the control group, or in some cases, lower than those in the control group. However, lymphocytes treated with dichloromethane or ethyl acetate fractions and exposed to SNP continued to show high ROS concentrations. These fractions decreased the ROS levels generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure to levels similar to those observed in the control group. Therefore, these two fractions showed a specificity of their antioxidant activity since they decreased ROS levels in cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not in the cells exposed to SNP.

Considering the effect of *P. xanthogloea* extract/fractions on lymphocytes viability (**Figure 5**) neither the crude extract nor the n-butanol fraction altered cell viability when compared with the control group. In contrast, 300 µg/mL of the crude extract and water decreased the cell viability in the presence of SNP. The hexane and ethyl acetate fractions did not change the viability pattern at any of the concentrations tested here. On the other hand, in the presence of SNP, these fractions significantly reversed the toxicity.

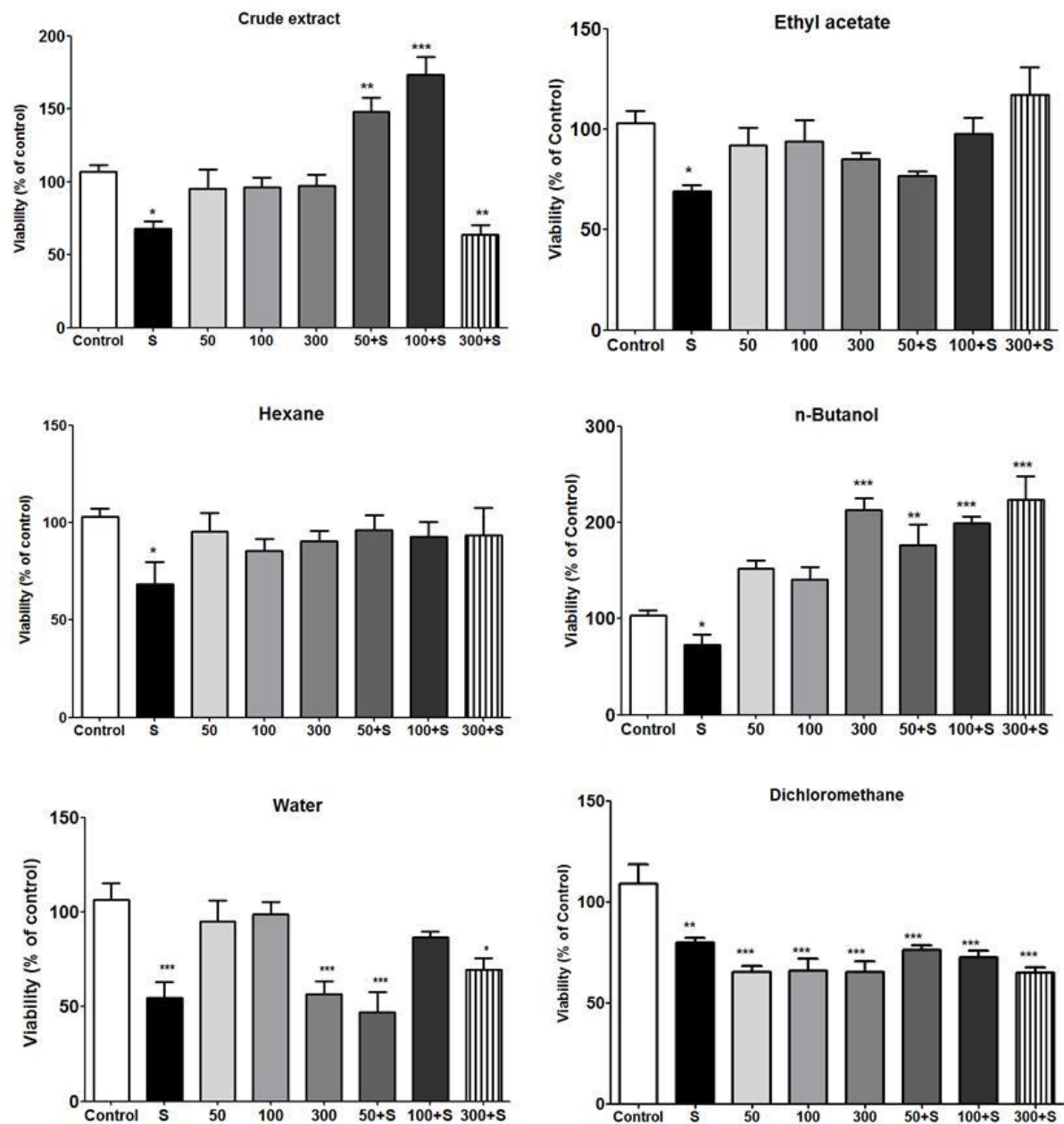


Figure 5: Effect on human lymphocytes viability of *P. xanthogloea* extract/fractions ( $\mu\text{g/mL}$ ) with and without sodium nitroprusside (S) exposition a prooxidant molecule that generates higher nitric oxide (NO) levels. The different concentrations of each extract/fractions were statistically compared by oneway analysis of variance followed by Dunnet *post hoc* test. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

The water fraction at 300  $\mu\text{g/mL}$  showed cytotoxic effect when compared to the control group, and at 100  $\mu\text{g/mL}$  concentration this fraction was able to reverse the SNP cytotoxic. However, the dichloromethane fraction caused cytotoxicity at all concentrations investigated and was not able to decrease cell death in the lymphocytes exposed to SNP.

## DISCUSSION

The Brazil presents a mega biodiversity, mainly associated to different ecosystems including Pampa biome. However, in this biome the last twenty years increased the number of species threatened with extinction by social factors as expansion of monocultures and construction of dams [1]. Several species, including *P. xanthogloea* are used in popular medicine without scientific studies to confirm its potential effects. However, for our best knowledge, this is the first study involving identification and quantification of phenolic composition as well as  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NO modulation by *Pavonia* species. The analysis of phenolic compounds in *P. xanthogloea* extract and fractions detected four main molecules: tiliroside, quercetin, gallic and chlorogenic acids.

Despite the few number of phenolic molecules found in *P. xanthogloea* the extract and the most fractions presented some antioxidant activity. The high antioxidant capacity observed in ethyl acetate and water fraction probably is due higher tiliroside concentrations.

Tiliroside is a glycoside flavonoid [kaempferol 3-O-(6''-trans-p-coumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside] and is present in several medicinal and dietary plants, such as rose hip, strawberry and linden [14,15,16]. Despite to be less studied than other polyphenols as catechin and quercetin, previous investigations of tiliroside biological activity have described antioxidant activity [17,18,19] as well as other biological properties including described anti-inflammatory, anticarcinogenic and anti-obesogenic tiliroside effects [15,16,17,20,21]. The n-butanol fraction also presented antioxidant activity probably due higher quercetin concentration, a glycosylated form of quercetin [22].

The NO and  $\text{H}_2\text{O}_2$  are natural components of living cells and serve various biological functions. However, high concentrations of these molecules cause oxidative stress that can be reversed by chemicals with antioxidant properties [16]. Therefore, the identification of plant extract that are able to modulate the levels of these ROSs are pharmacologically relevant. The whole of results suggested that *P. xanthogloea* has an important modulatory antioxidant activity, as indicated by SNP- and  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure-induced ROS levels. However, this effect was both fraction- and concentration-dependent. The differences among antioxidant effects

observed in the *P. xanthogloea* extract and fractions could indicate potential differential biological properties as antimicrobial, antitumoral, antiinflammatory etc. For these reason complementary studies exploring the *P. xanthogloea* effects are important to be performed.

## CONCLUSION

Considering the presence of, at least of four important phenolic compounds are present in *P. xanthogloea* extract/fractions and probably contribute to antioxidant activity observed from no-cell and cell *in vitro* assays. These results suggest that this specie could to be medicinal properties.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to Biogenomic Lab researchers and Natural Products Research Group for help technical support and experiments.

## REFERENCES

1. Grings M, Krapovic A, Boldrini I. A New Species of *Pavonia* (Malvaceae) from Southern Brazil. *System Bot* 2011; 36:419-423.
2. Nakhare S, Garg SC. Antimicrobial activity of the essential oil of *Pavonia odorata* willd. *Anc Sci Life* 1992; XII(1,2): 227 – 230.
3. Nakhare S, Garg SC, Bhagwat AW. Pharmacological screening of the essential oil of *Pavonia odorata* willd. *Anc Sci Life* 1997; 17(1):23 – 27.
4. Boer HJ de, Koola A, Broberg A, et al. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *J Ethnopharmacol* 2005; 96:461–469.
5. Vahitha R, Venkatachalam MR, Murugan K, Jebanesan A. Larvicidal efficacy of *Pavonia zeylanica* L. and *Acacia ferruginea* D.C. against *Culex quinquefasciatus* Say. *BioresourTechnol* 2002; 82(2): 203-204.

6. Andrade TU de, Ewald BT, Freitas PR, et al. *Pavonia alnifolia* a. St. Hil.: in vivo hypotensive effect and in vitro ace inhibitory activity. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012; 4(1):124-126.
7. Kumari A, Lalitha KG, Venkatachalam T, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Pavonia zeylanica* Linn. *Asian J Res Pharm Sci* 2011; 1(4): 113-116.
8. Kalarani DH, Dinakar A, Senthilkumar N. Analgesic and anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of *Alangium salvifolium* and *Pavonia zeylanica*. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2012; 17(1): 77-80.
9. Basu SK, Rupeshkumar M, Kavitha K. Hepatoprotective and antioxidant effect of *Pavonia zeylanica* against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Int J Pharm Bio Sci* 2012; 3(1): 407-415.
10. Jacob C, Jamier V, Ba LA. Redox active secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol* 2011; 15:149–155.
11. Landete JM, Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;5 2(10):936-48.
12. Mohan A, Narayanan S, Sethuraman S, Krishnan UM, Combinations of plant polyphenols & anti-cancer molecules: a novel treatment strategy for cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Feb;13(2):281-95
13. Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, dos Santos GF, Algarve TD, Marinowic DR, Ribeiro EE, Soares FA, Barbisan F, Athayde ML, Cruz IB. The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem Toxicol* 2013; 53: 119–125.
14. Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, Yoshikawa M. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorg Med Chem* 2002;10(3):707-12.



15. S Tsukamoto S, Tomise K, Aburatani M, et al. Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*. *J Nat Prod* 2004; 67: 1839–1841.
16. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Mánëz S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, et al. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol* 2003; 461: 53–61.
17. Rao YK, Geethangili M, Fang SH, Tzeng YM. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 1770–1776.
18. Yang C, Li F, Zhang X, et al. Phenolic antioxidants from *Rosa soulieana* flowers. *Nat Prod Res* online publication 28 Jun 2013; Doi:10.1080/14786419.2013.811660.
19. Aderogba MA, McGaw LJ, Bezabih M, Abegaz BM. Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. *Nat Prod Res* 2011; 25:1224-33.
20. Goto T, Teraminami A, Lee JY, Nagatomo A, Nishida N, Matsuura Y, Nagaoka S. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *J Nutr Biochem* 2012; 23:768-76.
21. Tsimplouli C, Demetzos C, Hadzopoulou-Cladaras M, et al. In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. *Eur J Nutr* 2012; 51:181-90.
22. Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res* 2000; 33: 667–676.



### 3.2 Manuscrito 2

## **The human Ala16Val SOD2 polymorphism influence erythrocyte hemolysis exposed to a protein kinase C inhibitor**

Clarice Pinheiro Mostardeiro<sup>a,f</sup>, Ademir Farias Morel<sup>b</sup>, Marco Aurélio Mostardeiro<sup>b</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>c</sup>, Tiago Duarte<sup>a</sup>, Etiane Tatsch<sup>a</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>a</sup>, Cristina da Costa Krewer<sup>d</sup>, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha<sup>d</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>e,f</sup>, Maria Fernanda Mânica-Cattani<sup>f</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,e,f\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup> LabMed, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>f</sup> Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

\* Corresponding author: Ivana B M da Cruz

Address: Av Roraima 1000, Prédio 19, Laboratório de Biogenômica-UFSM

Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-32208736 Fax: 55-55-32208239

Email: ibmcruz@hotmail.com

**Abstract**

The aim of this study was to investigate if SOD2 could be implicated in the human hemolysis response and in this way to affect the *in vitro* toxicological results of drugs and natural compounds when hemolytic assay is used. To perform the study we used blood from healthy adult donors with different genotypes of a SOD2 gene polymorphism (Ala16Val-SOD2) polymorphism that were exposed to chelerythrine (CHE) that decreases the erythrocyte deformability to evaluate the hemolysis and oxidative parameters. The results showed that erythrocytes from carriers of the AA genotype presented lower levels of hemolysis, advanced oxidation protein products (AOPP) and nitrate/nitrite (NOx) levels than carriers of the VV genotype. However, in the presence of CHE treatment, AA genotypes showed greater sensitivity than V carriers. These results suggest that SOD2 presents some influence on erythrocyte biology and that toxicology studies involving hemolytic assay using human cells could be consider the effect of genetic variation in genes related direct and indirectly to erythrocyte metabolism.

**Key-words**

Ala16Val-SOD2, MnSOD, red blood cells, hemolytic activity, oxidative stress, toxicogenetic

## Introduction

The erythrocytes, the most abundant cells in blood, as a consequence of their physiologic role, are exposed to continuous reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) produced in different organs and tissues during blood circulation. To prevent erythrocytes damage exist protective mechanisms to scavenge and detoxify ROS, block production, or sequester transition metals that include antioxidant enzymatic and nonenzymatic systems. (Masella et al., 2005).

The increase of ROS/RNS levels cause oxidation in erythrocytes structural lipids as well as deformations of the cytoskeletal proteins leading loss membrane integrity and cell death (Claster et al., 1984; Cimen, 2008). The increase of ROS/RNS levels can represent toxic manifestations induced by several drugs or disease states (Cimen, 2008).

Therefore, the erythrocyte membrane fluidity can be viewed as an indirect marker of oxidative stress (Cazzola et al., 2003; 2004) and the oxidation of erythrocytes has been studied extensively as a model of oxidative damage of biomembranes (Chiu et al., 1982). The hemolytic assay using animal or human blood is easy and relatively inexpensive to address and can be also used to evaluate potential new natural and synthetic antioxidant compounds.

When hemolytic assay is performed with blood from healthy adult donors assay the researchers presuppose that membrane physiological erythrocyte conditions are similar and respond the same way to oxidizing agents or antioxidants. This presupposition is because when the erythrocytes emerge from the bone marrow; these cells lose its nucleus, ribosomes, and mitochondria and therefore all capacity for protein synthesis and the compounds into red blood are relatively stables.

There are evidences obtained from experimental models that gene variations could alter the erythrocytes membrane quality including antioxidant enzymes. Previous studies showed that superoxide dismutase manganese dependent (SOD2 or MnSOD) produced by a nuclear gene and that act into mitochondria can affect the erythrocytes quality. Friedman et al. (2001) created hematopoietic chimeras in which all erythrocytes were derived from fetal liver stem cells of either SOD2 knockout, heterozygous (knockout/wild type, or wild-type littermates). They observed that animals with erythrocytes derived from SOD2<sup>(-/-)</sup> cells were persistently anemic, a finding suggestive of a hemolytic process. An additional study from the same research group showed that SOD2 deficiency was associated with increased oxidative damage to erythrocytes and that the loss of SOD2 in erythroid progenitor cells resulted in enhanced protein oxidative damage, altered membrane deformation, and reduced red blood

survival. Interestingly, these erythrocytes presented a similar morphology to those found in human sideroblastic anemias (SAs) (Friedman et al et al., 2004).

Human beings present a polymorphism in SOD2 gene located mitochondrial targeting sequence (MTS) where an alanine are change to valine in 16 codon (Ala16Val-SOD2 polymorphism). The polymorphism in SOD2 affects the signaling peptide that targets the protein to the mitochondria and causes changes in enzyme efficiency against superoxide ion presents three genotypes: AA, VV and AV (Shimoda-Matsubayashi et al., 1996; Sutton et al., 2003). The differences in efficiencies of SOD2 Ala and Val alleles appears to be linked to differences in protein structure that result in variable transport into mitochondria. *In vitro* experiments using an Ala SOD2 precursor generated 30-40% more of the active, matrix-processed SOD2 homotetramer than Val SOD2 precursor (Shimoda-Matsubayashi et al., 1996).

As described in the recent review performed by Bresciani et al (2013), several studies has associated Ala16Val SOD2 with different neoplasias (Taufer et al., 2005; Bica et a al., 2009; Zejnilovic et al., 2009) and cardiometabolic morbidities (Gottlieb et al., 2005; Montano et al., 2009; Duarte et al., 2010; Jones et al., 2010). Beside, investigations *in vitro* indicate the occurrence of functional effect of Ala16Val-SOD2 polymorphism on cell oxidative metabolism (Martin et al., 2009; dos Santos Montagner et al., 2010; Montano et al., 2012; Costa et al., 2012).

Therefore, an indirect evaluation to determine whether oxidative stress causes similar damage in erythrocytes carriers with different Ala16Val-SOD2 genotypes is justified. To test this hypothesis analyzed the role of Ala16Val-SOD2 polymorphism influences *in vitro* human hemolysis response using blood samples from healthy adult donors with different genotypes which were exposed to chelerythrine (CHE) a protein kinase C (PKC) activity inhibitor that decreases the erythrocyte deformability and causes oxidative stress.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Design and sample subjects**

This study is part of a protocol previously approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria (n<sup>o</sup> process 23081.015838/2011-10) of a genetic study living in the southern region of Brasil (Duarte et al., 2010; Costa e al., 2012). All subjects signed consent term. Initially we selected 100 healthy adult subjects (56 males and 44 females), non-smokers, non-alcohol drinkers, non-chronic drug abusers, and without any

diseases or morbidity conditions that could influence the *in vitro* analysis to performed the Ala16Val-SOD2 polymorphism as well as hematological and oxidative stress biomarkers analyses. From this sample, we chose 12 subjects (four by genotypes) with similar biomarkers profile who represented all Ala16Val SOD2 genotypes for inclusion in the *in vitro* assays.

## **2.2 Blood sample collection and treatment conditions**

Peripheral blood samples were collected after 12h of overnight fasting by venipuncture, using top Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA. Experiments were conducted immediately after blood collection. Firstly, the blood samples of 100 subjects were analyzed for red blood cells count ( $10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobin (Hb, g/dL), white blood cell count (WBC, thousands/ $\mu\text{L}$ ) and red cell distribution width (RDW) from an automated hematology analyzer. A second blood collection (four subjects by genotype) in the similar conditions was performed in the blood donors to perform the *in vitro* analysis. The samples were spun in a refrigerated centrifuge at  $2500 \times g$  for 15 min to separate plasma, erythrocytes and leukocytes. Then, erythrocytes samples were placed in culture conditions without containing 1 mL of RPMI 1640 (GIBCO) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin. To avoid possible antioxidant variation among the samples, erythrocytes were maintained in controlled conditions at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere for 24 hours prior to treatment.

The erythrocytes were centrifuged and the supernatant was discarded. The same culture medium described for the CHE treatment was used for erythrocytes. The CHE was diluted in 0.1% DMSO, and the control group received an equal amount of DMSO added in  $1 \times 10^9$  cell/mL erythrocytes 0.1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  and 8  $\mu\text{M}$  CHE concentrations. The erythrocytes were incubated for 2 h and hemolysis, lipoperoxidation, antioxidant enzyme (catalase), advanced oxidation protein products (AOPP) and nitrate/nitrite ( $\text{NO}_x$ ) levels were analyzed to identify the effects of the CHE concentration on Ala16Val SOD2 genotypes.

## **2.3 Ala16Val-SOD2 polymorphism**

The genotype determination was performed as described in Costa et al (2012). Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using aDNA Mini purification kit (MoBio, California, USA). PCR amplifications were performed in a total volume of 50  $\mu\text{L}$  containing 5  $\mu\text{L}$  of X10 buffer, 1  $\mu\text{L}$  of 25 mmol  $\text{MgCl}_2$ , 1.25  $\mu\text{L}$  of 10 mmol dNTP, 0.5  $\mu\text{L}$  of Taq polymerase (Gibco, NY, USA), 1  $\mu\text{L}$  (40 pmol) of each primer, 3  $\mu\text{L}$  (0.25  $\mu\text{g}$ ) of genomic DNA and 34.5  $\mu\text{L}$  of dd  $\text{H}_2\text{O}$ . The amplification primers (Gibco, NY, USA) for a

110-bp fragment of the human SOD2 gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (sense strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (antisense strand) with thermocycler parameters comprising an initial cycle of 95°C for 5 min followed by 35 cycles at 95°C for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 1 min. The final cycle was followed by an extension period of 2 min at 72°C. The PCR product (10 µL) was digested with *Hae*III (15 U, 37°C, 6 h; Gibco, NY, USA). Digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 4% agarose gel (Amersham Biosciences, Sweden) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction site for *Hae*III in the -9 codon and the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp); -9Ala/Val (23, 85 and 110 bp); and -9Val/Val (110 bp). The SOD2 genotype frequencies were the following: AA, 26%; VV, 28%; and AV, 47%. The calculation of possible deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium, which was used to assess the chi-squared goodness-of-fit, showed that the samples were in genetic equilibrium.

## 2.4 Hemolysis assay

The extent of hemolysis was determined as described in Schiar et al. (2007) with minor modifications. After chelerythrine treatment, the erythrocyte media was centrifuged at 2000 rpm for 3 min at room temperature. The supernatant was discarded and 1 mL of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) with 6 mM glucose was added to 1 mL of erythrocytes (1x10<sup>9</sup> cells). The extent of hemolysis was analyzed by adding 24 µL of erythrocytes to 4 mL of saline-phosphate buffer. The concentration of hemoglobin indicates hemolysis was determined spectrophotometrically at 590 nm. The absorbance value of 100% hemolysis was determined by adding 24 µL of erythrocytes to 4 mL PBS containing 0.01% Triton X-100.

## 2.5 Oxidative stress biomarkers analysis

Oxidative stress parameters in the erythrocytes of Ala16Val SOD2 genotype samples were assessed, as follows. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the modified method of Jentzsch et al. (1996). Whole blood catalase activity was determined by the method of Aebi (1984) by measuring the rate of decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm. Non-protein thiols were assayed in plasma by the method of Ellman (1959). The AOPP and NOx levels were measured in erythrocytes using a Cobas MIRA<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer. AOPP was measured as previously reported (Selmeçi et al., 2008) and NOx levels was measured by a method



previously described and validated by Tatsch et al (2011). All sample were evaluated with erythrocyte concentrations of  $10^7$  cells and in triplicate.

## 2.6 Statistical Analysis

All the analyses were carried out using the statistical package for social studies SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Hematological parameters comparison among subjects with different Ala16Val-SOD2 genotypes was performed by one way analysis of variance followed by a Bonferroni *post hoc* test. Statistical significance of *in vitro* assays was assessed by a two way analysis of variance followed by a Tukey post hoc test. All p values were two-tailed, and the alpha value considered was  $p = 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Hematological and oxidative metabolism biomarkers

The Ala16Val-SOD2 genotypes hematological and biochemical parameters are presented in Table 1. The VV and AV erythrocytes present higher RDW than AA erythrocytes. The hemoglobin (Hb) concentration was higher in AA than VV whereas AV erythrocytes presented intermediary levels. However the differences among genotypes ranged into hemogram reference values.

The oxidative stress biomarkers that were evaluated in erythrocytes were also influenced by the three Ala16Val SOD2 genotypes. Erythrocytes from VV and AV genotypes presented higher lipid peroxidation than the AA genotype. AOPP levels were also higher in VV than AA genotypes, whereas AV genotypes had intermediary values. NOx levels were also genotype dependent (AA>VV>AV). AA erythrocytes presented higher levels catalase than erythrocytes V allele carriers whereas thiols levels were similar among samples with different Ala16Val-SOD2 genotypes.

**Table 1** Comparison of hematological and oxidative metabolism parameters among healthy volunteers with different Ala16Val-SOD2 genotypes

Variables	AA Mean±SD	VV Mean±SD	AV Mean±SD	p
Age (years)	48.2 ± 12.1 <sup>a</sup>	51.0 ± 15.6 <sup>a</sup>	49.0 ± 10.9 <sup>a</sup>	0.707
RBC Count (10 <sup>6</sup> / μL)	4.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	3.9 ± 3.0 <sup>b</sup>	5.5 ± 9.0 <sup>a</sup>	0.001
Hb concentration (g/dL)	12.3 ± 4.9 <sup>a</sup>	7.25 ± 5.3 <sup>b</sup>	9.47 ± 5.1 <sup>ab</sup>	0.002
WCC (thousands/μL)	6202.1± 991.2 <sup>a</sup>	6136.8±1497.4 <sup>a</sup>	5958.1±1554.4 <sup>a</sup>	0.710
RDW	102.8± 54.0 <sup>a</sup>	122.9 ± 48.5 <sup>a</sup>	124.4 ± 39.4 <sup>a</sup>	0.109
TBARS (nmol MDA/mL RBC)	0.373±0.22 <sup>a</sup>	1.255±0.209 <sup>b</sup>	1.395±0.054 <sup>b</sup>	0.049
AOPP (mmol/L)	48.3±1.76 <sup>a</sup>	92.1±1.17 <sup>b</sup>	75.8±1.91 <sup>c</sup>	0.001
Nitric oxide (mmol/L)	43.2±3.9 <sup>a</sup>	29.7±1.5 <sup>b</sup>	23.9±1.5 <sup>b</sup>	0.0001
Catalase (mmol of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL erythrocytes/min)	53.9±2.4 <sup>a</sup>	39.89±2.3 <sup>b</sup>	55.2±5.8 <sup>a</sup>	0.05
Thiols (μmol/mL erythrocytes)	2.52±0.22 <sup>a</sup>	2.92±0.17 <sup>a</sup>	2.63±0.11 <sup>a</sup>	0.80

SD= standard deviation; Hb= hemoglobin, WCC = White cell concentration RDW= Red Cell Distribution Width; Different letters represent significant differences among genotypes (p values ≤ 0.05). Different letters represent significant differences among genotypes.

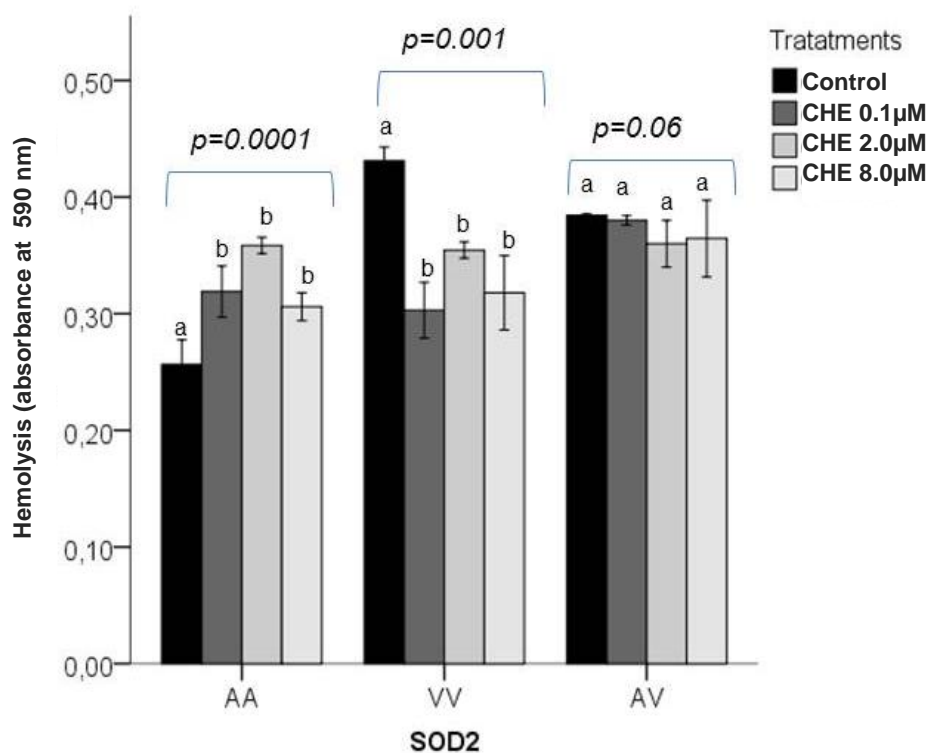
### 3.2 Hemolytic analysis

We compared the extent of erythrocyte hemolysis among Ala16Val-SOD2 genotypes without any chemical compound exposition. AA-erythrocytes presented lower levels of hemolysis (0.257±0.011) than VV-erythrocytes (0.431±0.006), with AV-erythrocytes presenting intermediary values (0.384±0.005). This pattern indicates that the alleles have a co-dominant effect on erythrocyte hemolysis (F=22.791, p=0.001).

When we considered the CHE exposition we did not find any effect of CHE treatment on hemolysis (p=0.581) in the whole sample. However, when the sample was categorized by Ala16Val-SOD2 this result changed and the hemolysis presented significant differences considering different chelerythrine concentrations (Figure 1).

Compared to control treatment, AA-erythrocytes showed a significant increase in hemolytic response across all CHE concentrations (F=12.43, p=0.002): the 0.1 mM CHE

treatment increased 24.6%, 0.2 mM CHE treatment increased 25.7% and the 0.8 mM CHE treatment increased 20.1%. In contrast, CHE treatment of the VV-erythrocytes presented a significant decrease in the level of hemolysis compared to VV controls: the 0.1 mM CHE treatment decreased 29.7%, the 0.2 mM CHE treatment decreased 27.3% and the 0.8mM treatment increased 26.2%. No significant differences in hemolysis were observed among CHE treatments in erythrocytes with AV genotypes.



**Figure 1** Chelerythrine effect of A inducer PKC, on hemolysis of blood cells carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes. Different letters indicate significant differences evaluated by analysis of variance followed by Tukey post hoc test.

### 3.3 CHE effect on oxidative erythrocytes parameters

Because we did not observe differences among CHE concentrations, additional analyses of oxidative metabolism variables were only performed in the 0.1 µM concentration condition (Figure 2).

The CHE affect the lipid peroxidation only in erythrocytes carrier AA genotypes; we observed an increase in TBARS levels under CHE treatment, compared to controls ( $p=0.002$ ). In the other genotypes (VV and AV) TBARS levels did not change among erythrocytes with and without treatment with CHE.

NO<sub>x</sub> levels were also affected by CHE treatment in all genotypes. In the AA genotype a significant decrease in NO<sub>x</sub> levels was associated with CHE exposition. In contrast erythrocytes with VV and AV genotypes showed increased NO<sub>x</sub> levels in response to treatment with CHE.

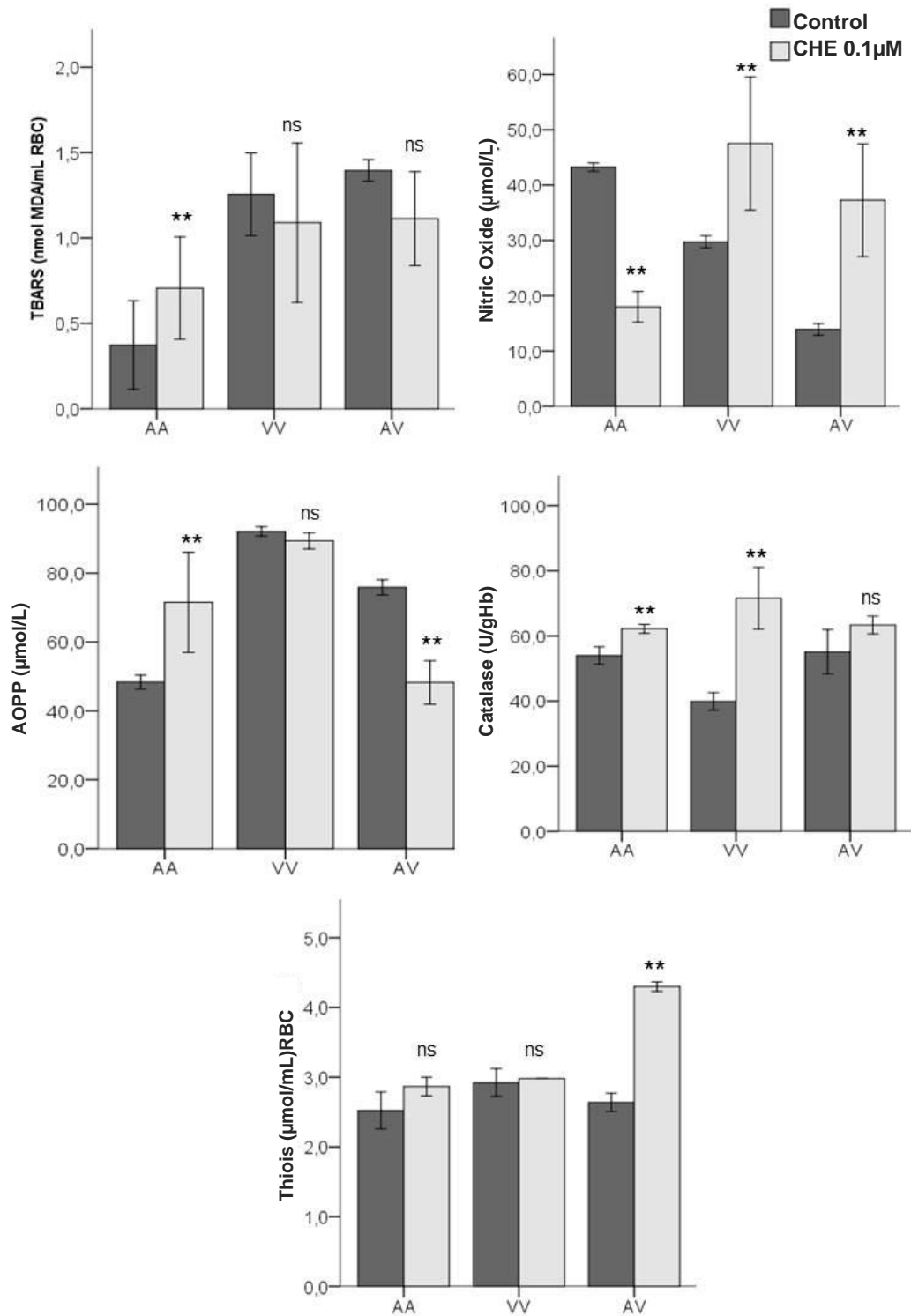
Although VV genotypes did not demonstrate altered AOPP levels in response to CHE, in RBC carriers of AV and AA genotypes we observed a significant increase in this oxidative biomarker. The AOPP treatment also affected the RBC carriers of the heterozygous genotype. However, in contrast to AA genotypes, CHE treatment significantly decreased AOPP when compared to the control group.

The antioxidant biomarkers investigated in this study were also affected by CHE treatment. CHE treatment increases catalase levels in all Ala16Val SOD2 genotypes. However, CHE treatment only increases thiols levels in the carriers of the AV genotype.

#### **4. Discussion**

For the best of our knowledge this is the first study that described effect of Ala16Val-SOD2 polymorphism in erythrocyte biology. The results suggest that lower human SOD2 efficiency could affect the properties of mature erythrocytes.

The biological explanation for these findings might lie with our knowledge of SODs functions. During erythropoiesis, superoxide ion excess may result from lower SOD2 efficiency, and this molecule can react to NO present in the cells, producing peroxynitrite. Peroxynitrite is known to oxidize sulfhydryls and yields products indicative of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) reactions with deoxyribose and dimethyl sulfoxide. Thus, peroxynitrite may damage cells by promoting membrane lipid peroxidation and nitration of proteins on tyrosine residues (Radi et al., 1991). The production of lipid peroxides interferes with the regulation of several metabolic pathways and can be generated either inside erythrocytes, through the hemoglobin oxidation pathway, or outside erythrocytes, by stimulating macrophages. SOD and catalase levels were higher in AA-erythrocytes when compared to V allele carriers and these data corroborate previous studies that found similar results (Duarte et al., 2010).



**Figure 2** Oxidative metabolism variables in erythrocytes carriers different Ala16Val-SOD2 genotypes exposed to chelitrine at 0.1 mM concentration. Significant differences evaluated by analysis of variance followed by Tukey post hoc test (\*\* $p < 0.01$ ).

The analysis of oxidative and antioxidant biomarkers evaluated here suggests that erythrocytes from carriers of the VV genotype could be impaired by alterations of their membrane structure and of other proteins and enzymes and molecules. This suggestion is in concordance by previous studies that described alterations in erythrocytes from SOD2<sup>-/-</sup> knockout mice (Friedman et al., 2004). These mice presented a lethal phenotype, the time of death is dependent on the genetic background. SOD2 knockout mice have several pathological dysfunctions, including an increase in oxidative DNA damage and mitochondrial respiratory chain defects in (Melov et al., 2001). Although, heterozygous animals appear normal, show increased oxidative damage to mitochondrial DNA, decreased levels of reduced glutathione, altered mitochondrial and altered erythrocytes function (Williams et al., 1998).

Additionally, other studies, as developed by Friedman et al. (2004) showed that the reconstitution of mice with SOD2 deficient hematopoietic stem cells results in a hemolytic anemia that recapitulates many features seen in SA patients. The loss of SOD2 in erythroid progenitor cells results in enhanced protein oxidative damage, altered membrane deformation, and reduced erythrocytes survival. The authors suggested that anemia resulting from SOD2 deficiency could be due to a developmental red blood cell defect that is unmasked upon exposure to oxidative stress during circulation. The partial pressure of oxygen in the marrow, as well as in the spleen, is estimated to be quite low and therefore these environments may be a relatively permissive environment, in which SOD2-deficient cells can develop with minimal oxidative damage. The “defect” related to alterations found in mice with SOD2 deficiency may present the same defect as related to the results described here, probably involving the erythrocyte membrane.

Martin et al. (2011) also observed persistent hemolytic anemia in mice irradiated and reconstituted with SOD2 deficient hematopoietic cells. Flow cytometry and gene expression profiling of erythroblasts indicated that erythroblasts with SOD2 deficiency underwent mitochondrial oxidative stress and showed reduced expression of multiple nuclear genes encoding components of the respiratory chain, TCA cycle, mitochondrial protein synthesis and deregulation of iron delivery.

We also found higher erythrocyte frailty and oxidative stress in VV genotype red blood cells suggesting that SOD2 impacts erythrocyte quality through an important functional role in human erythropoiesis. In our study, differences in basal hemolysis were observed in erythrocytes with different Ala16Val SOD2 genotypes, corroborating the idea that, when the cells were produced in an environment deficient SOD2, they are likely to present membrane alterations that increase their frailty.

Additionally, our results showed some evidence that SOD2 efficiency could affect Hb function and the functions of other proteins and enzymes. This premise is based on the observation that basal NO<sub>x</sub> levels in RBCs of VV and AV genotypes were lower than levels in AA carriers and that in the presence of a PKC inhibitor (CHE), this pattern changed.

Over the last two decades, NO has emerged as an important signaling molecule oxygen supply and others physiological systems (Ho et al., 2012). NO is produced enzymatically by several cells mainly endothelial cells that line the vascular system, after which it diffuse into muscle, vessels and blood. In blood, the NO reacts with protein molecules present in the plasma and finally reaches erythrocytes. Physiologically, is accepted that there is a delicate balance between the synthesis and decomposition of NO in the two major compartments of blood (plasma and red cells), due the reactive nature of NO (Reeder, 2010; Ho et al., 2012).

The mechanism and the rate of NO elimination are dependent on its concentration, diffusibility and the concentration of the other reactive molecules. In erythrocytes, all hemoproteins have the capacity to react with NO, including Hb. The reaction occurring between NO and hemoglobin (Hb) is rapid and is important for both blood vessel function and circulation. Human Hb reacts with NO by one of two possible routes: (a) high-affinity binding of NO to deoxyferrous Hb and (b) the conversion of NO to nitrate by oxyferrous Hb (Ho et al., 2012). These reactions could point to a possible mechanism explaining the hypoxic vasodilatation process through the allosteric quaternary structural transition of Hb, playing the role of oxygen sensor (de Rosa et al., 2008). This potential Hb sensor could trigger either the release of S-nitrosothiol from S-nitrosated Hb (SNO-Hb) or the reduction of the anion nitrite to NO, which is related to the modulation of Hb gaseous exchanges (Reeder, 2010).

Because our study included only *in vitro* protocols, using erythrocytes that were kept in controlled nutritional and gas exchange conditions we believe that the oxidative stress and modulation of NO<sub>x</sub> levels. Ther observed were generated by the erythrocyte themselves. Without other oxidative stress sources (such as immune cells) and NO production from the endothelial line, the NO generation by red cell in this study likely results from the reduction of the anion nitrite to NO by Hb (Reeder et al., 2010).

The anion nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) constitutes a biochemical reservoir for NO that may be catalyzed by hemoglobin, myoglobin or other metal-containing enzymes. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> increasing rates under conditions of physiologic hypoxia or ischemia (Reeder et al., 2010). In our study, under basal conditions, NO<sub>x</sub> levels were higher in erythrocytes from carriers of the AA genotype. However, in the presence of CHE, the inverse was true; red cells from carriers of

the VV and AV genotypes presented a significant increase in NO<sub>x</sub> levels when compared with controls, while erythrocytes from AA genotype carriers showed a decrease in the level of NO<sub>x</sub>. An important open question is why and how PKC is related to NO regulation in red cells.

PKs are the largest group of kinases. They function by modifying the activity of specific target proteins via phosphorylation of specific amino acid residues. These enzymes are integral parts of many signal transduction pathways and therefore mediate a variety of specific cellular functions. In erythrocytes, two serine/threonine kinases are present: PKA and PKC (Dreyfuss et al., 1978). PKC is involved in erythrocyte deformability, a key feature responsible for the maintenance of red cell in the microcirculatory system (Sakashita et al., 1999). PKC imbalance has been associated with many physiological and pathological processes of erythrocytes, including Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase pump functions, the senescence process, essential hypertension and several events associated with sickle cell anemia.

The possible involvement of erythropoiesis in the modulation or functions of PKC is a question that remains to be elucidated we can that SOD2 impacts RBC the quality through an important functional role in human erythropoiesis. Therefore, the results presented here suggest toxicogenetic influence of SOD2 in hemolytic assay using human cells.

## **Acknowledgments**

The authors thank the research team from Laboratory of Biogenomic (UFSM), especially Greice F Feyh dos Santos Montagner, for helping with data collection. We also thank CNPq, CAPES, FAPERGS and FAPEAM for grants and fellowships support.

## **References**

- Aebi H, 1984 Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105,121–6.
- Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NV, da Cruz IB, Sá G, Graudenz MS, Zettler CG, 2009 MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathol Oncol Res.*15, 19-24
- Bresciani G, et al., 2013 The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to Human Diseases and Interaction with Environmental Factors. *Free Radical Research.* 47, 781-792.



- Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B, 2003 Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest.* 33, 924-30.
- Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B, 2004 Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res.* 45, 1846-51
- Chiu D, Lubin B, Shohet SB, 1982 in: *Free Radicals in Biology*, Vol. V (Pryor, W.A., Ed.), pp. 115-160
- Cimen MY, 2008 Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 390, 1-11.
- Claster S, Chiu DT, Quintanilha A, Lubin B., 1984 Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood* 64, 1079-84.
- Costa F, Dornelles E, Mânica-Cattani MF, Algarve TD, Souza Filho OC, Sagrillo MR, Garcia LF, Cruz IB, 2012 Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed Online.* 24, 474-81.
- de Rosa MC, Alinovi CC, Galtieri A, Russo A, Giardina B, 2008 Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: New insights in gas transport and metabolic modulation. *IUBMB Life.* 60 (2), 87-93.
- dos Santos Montagner GF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, da Cruz IB, 2010 Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro.* 24, 1410-6.
- Dreyfuss G, Schwartz KJ, Blout ER, 1978 Compartmentalization of cyclic AMP-dependent protein kinases in human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75,5926-30.
- Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, Schetinger MR, Loro VL, 2010 Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem.* 43,1118-23.
- Ellman GL, 1959 Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82, 70-7.
- Friedman JS, Rebel VI, Derby R, et al. 2001 Absence of mitochondrial superoxide dismutase results in a murine hemolytic anemia responsive to therapy with a catalytic antioxidant. *J Exp Med.* 193, 925-934.
- Friedman Js et al., 2004 SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness. *Blood.* . 104 (8), 2565-73.
- Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IB, 2005 Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res.* 4, 691-703.

- Ho JJ, Man HS, Marsden PA, 2012 Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med (Berl)*. 90,217-31.
- Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK, 1996 Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biol Med*. 20:251–6.
- Jones DA, Prior SL, Tang TS, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, Stephens JW, 2010 Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. *Diabetes Res ClinPract*. 90, 196-201.
- Martin F M, Bydlon G, Friedman JS, 2006 SOD2-deficiency sideroblastic anemia and red blood cell oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 8, 1217-25.
- Martin RC, Li Y, Liu Q, Jensen NS, Barker DF, Doll MA, Hein DW., 2009 Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes. *DNA Cell Biol*. 28, 3-7.
- Martin FM et al., 2011 SOD2 deficient erythroid cells up-regulate transferrin receptor and down-regulate mitochondrial biogenesis and metabolism. *PLOS One*. 6 (2), e16894.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C, 2005 Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 16, 577-86.
- Melov S, Doctrow SR, Schneider JA, Haberson J, Patel M, Coskun PE, Huffman K, Wallace DC, Malfroy B, 2001 Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J Neurosci*. 21, 8348-53.
- Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer Cda C, da Rocha MI, Mânica-Cattani MF, Soares FA, Rosa G, Maris AF, Battiston FG, Trott A, Lera JP, 2012 Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 60, 30-3.
- Montano MA et al., 2009 Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Molecular and cellular biochemistry*. 328, 33-40.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA, 1991 Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 288, 481-7.
- Reeder BJ, 2010 The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 13,1087-123.
- Sakashita K, Oonishi T, Ishioka N, Uyesaka N, 1999 Endothelin-1 improves the impaired filterability of red blood cells through the activation of protein kinase C. *Jpn J Physiol*. 49,113-20.

- Schiar VP, dos Santos DB, Lüdtke DS, Vargas F, Paixão MW, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB, 2007 Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicol In Vitro*. 21,139-45.
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y, 1996 Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 226, 561-5.
- Selmeci L, Seres L, Soós P, Székely M, Acsády G, 2008 Kinetic assay for the determination of the oxidative stress biomarker, advanced oxidation protein products (AOPP) in the human blood plasma. *Acta Physiol Hung*. 95(2):209-18.
- Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F, 2003 The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 13, 145-57.
- Tatsch E, Bochi GV, Pereira Rda S, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, Gomes P, Duarte MM, Moresco RN, 2011 A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*. 44 (4), 348-50.
- Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB, 2005 Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 60, 432-8.
- Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A, 1998 Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem*. 273, 28510-5.
- Zejniliovic J, Akev N, Yilmaz H, Isbir T, 2009 Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 189, 1-4.



### 3.3 Manuscrito 3

## **Effect of *Pavonia xanthogloea* (Ekman, Malvaceae) extract and fractions on prostate cancer cell line and human erythrocytes with different Ala16Val-SOD2 gene polymorphism**

Clarice Pinheiro Mostardeiro<sup>1</sup>, Ademir Farias Morel<sup>2</sup>, Marco Mostardeiro<sup>2</sup>, Raul de Oliveira<sup>3</sup>, Pauline Ledur<sup>1</sup>, Francine Carla Cadoná, Alencar Kolinski Machado<sup>1</sup>, Verônica Azzolin<sup>1</sup>, Tális de Oliveira Silva<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>2</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

### **Correspondence**

Profa Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Address: Av Roraima 1000, Prédio 19, Laboratório de Biogenômica-UFSM, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-32208736 Fax: 55-55-32208239, Email: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

**Abstract**

The Pampas of South America is considered a grassland biome with high biodiversity. Several native species are used in traditional medicine mainly from Malvaceae family. However, scientific investigations of these species are still incipient. This is the case of *Pavonia xanthogloea* which are popularly known “herb sheep” and used as antitumoral against prostate cancer. Therefore, the aim of present study was evaluate the potential *in vitro* effect of *P. xanthogloea* extract, fractions and the isolated tiliroside against prostate cancer using the DU-245 cancer cell line. The potential hemolytic effect on human erythrocytes with different genotypes of Ala16Val-SOD2 gene polymorphism was also evaluated to determine if *P. xanthogloea* could be toxic to health cells. A chemotherapeutic drug doxorubicin was used as positive control drugs. The cytotoxic and antiproliferative *P. xanthogloea* effects of crude extract as well as five fractions (hexane, n-butanol, ethyl-acetate, dichloromethane, aqueous) were investigated. The tiliroside isolated from the *P. xanthogloea* results was also tested as well as the chemotherapeutic doxorubicin was used as positive control. The results, similar to cells treated with doxorubicin showed antitumor effect of *P. xanthogloea* of extract/fractions mainly in 200-300 µg/mL concentrations, with exception of dichloromethane extract. The tiliroside appears to contribute to antitumor effect. The erythrocyte exposition to *P. xanthogloea* presented an anti-hemolytic effect of all extract/fractions from 30 to 300 µg/mL concentrations independent of Ala16Val-SOD2 polymorphism. From these data is possible to suggest that *P. xanthogloea* presents antitumoral effect against prostate cancer, as indicated by popular use without apparent toxic effect on health cells.

**Keywords:** Antitumoral, cytotoxicity, DU-245 cells, Ala16Val-SOD2 polymorphism, Tiliroside, *Pavonia xanthogloea*

Chemical compounds studied in this article

Tiliroside (PubChem CID:5320686);

## 1. Introduction

The Pampas of South America are a grassland biome. This region presents flat, fertile plains that cover an area of 300.000 sq. miles or 777.000 square kilometers, from the Atlantic Ocean to the Andes Mountains. It is found primarily in Argentina and extends into Uruguay and in the Southern Brazilian region (Rio Grande do Sul State). The Brazilian Pampa is located between latitudes 28°00' S and 34°00'S and longitudes 49°30 W and 58°W (Roesch et al., 2009). The humid Pampas ecosystem is one of the richest grazing areas in the world and is considered one of the main hotspots of the world's diversity (Lupatini et al., 2013). In Rio Grande do Sul state, there are approximately 400 species of grasses and 150 species of legumes belonging to botanical families of great importance from the forage point of view (Boldrini, 1997). This biome also present a large number of Malvaceae family species, a family of flowering plants containing over 200 genera with approximately 2.300 species. The largest genera in terms of number of species include *Hibiscus*, *Sida* and *Pavonia*. The *Pavonia* genus is represented by 250 species, and 134 were geographically distributed in Brazil. In the Brazilian Pampa biome there are many *Pavonia* species, someone are rare, and occurred in small geographical areas (Grings et al., 2011).

In Brazilian Pampa region that is historically occupied by a population named "Gaúcho" that is a term commonly used to describe the nomadic and colorful horsemen and cowhands of the South American pampas, some Malvaceae species are used as traditional medicine. This is the case of *Pavonia xanthogloea* which are popularly known as 'erva-de-ovelha' (herb sheep). Traditionally, this specie is used as antimicrobial and as antitumoral against prostate cancer treatment (Garcia, 2007).

Some *Pavonia* species are used in traditional medicine of several countries and evidences suggest the presence of biological effects of these species such as antimicrobial activity (Nakhare et al., 1992; Boer et al., 2005); larvicidal activity (Vahitha et al., 2002), anti-inflammatory activity (Kumari et al., 2011; Kalarani et al., 2012), antinociptive activity (Kumari et al., 2011; Kalarani et al., 2012), anti-hipertensive activity (Andrade et al., 2012), hepatoprotective and antioxidant activity (Basu et al., 2012).

However, studies describing *Pavonia* activity as antitumor medicine were not identified despite other closely Malvaceae species from others genus exhibit antitumoral activity against several cancer types as: colorectal cancer (Gul et al., 2011; Abd Ghafar et al., 2013; Still et al., 2013), lung cancer (da Silva et al., 2012), ovarian cancer (Da Silva et al., 2012; Dai et al., 2012), prostate cancer (da Silva et al., 2012), brain cancer (Choi et al., 2012),

melanoma cancer (Li et al, 2013), retinoblastoma (Gul et al., 2011), gastric cancer (Lin et al., 2007), skin cancer (Sharma et al., 2004; da Silva et al., 2012) and leukemia (Hou et al., 2005; Sharma et al., 2004).

A recent investigation performed by Mostardeiro et al. (2014a) described the presence of polyphenols as well as the antioxidant activity of *P. xanthogloea* extract and fractions. The tiliroside was the molecule detected in all extract. The study showed important antioxidant activity of crude extract, hexane, water, and n-butanol because the extract and these fractions were able to reverse the higher ROS levels generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide to levels similar to those observed in the untreated control group. The tiliroside and other bioactive molecules present in *P. xanthogloea* extracts are known by their activity against cancer cell lines (Tsimplouli et al., 2012).

Therefore, the aim of present study was evaluate the potential *in vitro* effect of *P. xanthogloea* extract, fractions and the isolated tiliroside against prostate cancer using the DU-245 cancer cell line. Two chemotherapeutic drugs (paclitaxel and doxorubicin) were used as positive control drugs.

In addition, the potential cytotoxic effect of these extracts on health cells was also evaluated from haemolysis assay. This assay was used because the mechanical stability of the erythrocytic membrane is a good indicator for the screening of cytotoxicity (Sharma and Sharma, 2001). In the haemolysis assay, a complementary analysis was performed to estimate whether *Pavonia* extract/fractions cytotoxicity could to be influenced by the genetic polymorphism Ala16Val which occurs in the human superoxide dismutase manganese dependent gene (Bresciani et al., 2013). This analysis was based in previous studies that suggest toxicogenetic effect of Ala16Val-SOD2 polymorphism on human lymphocytes exposed to UV irradiation (Montagner et al., 2010) and erythrocytes exposed to protein kinase inhibitor (Mostardeiro et al., 2014b).

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Chemicals.**

All chemicals used in this study were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, USA.), Invitrogen (USA), or Cultilab Co. (São Paulo, Brazil), unless otherwise stated.



## 2.2. *P. xanthogloea* material

Samples of this species were collected from the Caçapava do Sul municipality in the Brazilian Pampa biome, located in the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul. The Brazilian Pampa lies within the South Temperate Zone where grasslands scattered with shrubs and trees are the dominant vegetation (Roesch et al., 2009). The species was identified by a botanical specialist and a sample of the collected material is archived as voucher specimen number SMDB 13.744 at the Herbarium of Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

## 2.3. *P. xanthogloea* extract and fraction preparations

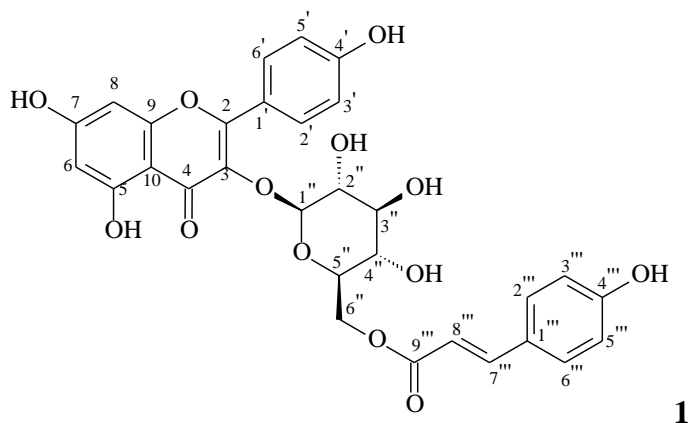
The extract and fractions used in the present study were previously characterized by Mostardeiro et al (2014). Briefly, the aerial parts of *P. xanthogloea* (900 g) were initially macerated with ethanol (EtOH) (5 × 1 L) and maintained at room temperature over a period of 48 h. The ethanolic extract was filtered and vacuum evaporated to dryness to obtain a crude extract (120 g). The crude extract (100 g) was suspended in water and repeatedly fractionated with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and n-butanol. The fractions and extract were filtered. The solvents were removed using a rotary evaporator under reduced pressure, and further chemically analysed. Tiliroside was detected in the extract and all fractions. The ethyl-acetate, water and crude extract presented higher concentrations of this molecule ( $81.67 \pm 0.80$ ,  $55.95 \pm 0.20$  mg/g and  $3.05 \pm 0.02$  mg/g, respectively). The only one fraction that presented quercitrin was n-butanol ( $11.09 \pm 0.05$  mg/g). Chlorogenic acid was also detected in ethyl-acetate fraction at  $6.47 \pm 0.03$  mg/g concentration, and crude extract, n-butanol and water fractions also presented this molecule in their composition, but in low concentrations ( $> 1$  mg/g). Gallic acid was also detected in crude-extract, ethyl acetate, n-butanol and water fractions but in concentrations  $> 3$  mg/g.

## 2.4. Tiliroside isolation from *P. xanthogloea*

The ethyl acetate fraction (3 g) was chromatographed on silica gel column (240 g) which was eluted with ethyl acetate containing increasing amounts of methanol (100:0→80:20), yielding compounds **1** (235 mg). The structure of **1** was established by HRMS and uni- and bidimensional NMR data by comparison with literature values (Chari et al., 1978; Cornelius et al., 2004). NMR spectra were acquired on a Brüker DPX-400 operating at 400 and 100 MHz, for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, respectively. Chemical shift are given in δ (ppm) using TMS

as internal standard. HR-mass spectra were recorded on a Bruker BioApex 70ev mass spectrometer.

#### 2.4.1 Tiliroside (compounds 1)



Yellow powder, m.p. 215-216°C.  $[\alpha]_D^{25} = -50$  (c 1.5, MeOH), EM= m/z 594 daltons. Data RMN de 1H ppm at 400.13 MHz,  $\delta$  3.26 (1H, m, H-4''); 3.39 (3 H, m, H-2'', H-3'', H-5''); 4.28 (2H, m, H-6''); 5.49 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1''); 6.09(1H, d, J=16 Hz, H-8''); 6.15 (1H, s, H-6); 6.38 (1H, s, H-8); 6.79 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3', H-5'); 6.85 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3''', H-5'''); 7.34 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2', H-6'); 7.37 (1H, d, J=16 Hz, H-7'''); 8.0 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2''', H-6'''). Data RMN de 13C ppm at 100.62 MHz,  $\delta$  156.8 (C-2); 133.6 (C-3); 177.8 (C-4); 161.6 (C-5); 99.1 (C-6); 164.8 (C-7); 94.2 (C-8); 156.9 (C-9); 104.3 (C-10); 121.2(C-1'); 130.6 (C-2', C-6'); 116,3 (C-3', C-5); 160.5 (C-4'); 101.5 (C-1''); 74.7 (C-2''); 76.7 (C-3''); 70.4 (C-4''); 74.6 (C-5''), 63.4 (C-6''); 125.4 (C-1'''); 131.3 (C-2''', C-6'''); 115.7 (C-3''', C-5'''); 160.3 (C-4'''); 145.1 (C-7'''); 114.1 (C-8'''); 166.6 (C-9''').

#### 2.5. Antitumoral assays

The DU-145 prostate cancer line was obtained from ATCC and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 Units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 2mM L-glutamine at 37°C under a humidified 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at one atmosphere. All assays were performed at least in triplicate with cells in exponential growth after adhesion to the bottom of the plates. To test the *P. xanthogloea* anticarcinogenic effect,

cells/well ( $2 \times 10^5$ ) were seeded into 96-well plates for cell adherence with three wells for each concentration level.

The *P. xanthogloea* effect on cell viability was observed after 24 hour of exposition and the effect on cell proliferation was determined after 72 hours of exposition. Both analysis were performed using two methods: MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Briefly, MTT was dissolved in phosphate buffered saline at 5 mg/ml, and added to each well and incubated for 1 hour. To dissolve formazan crystals, further incubation, was used DMSO. The absorbance at 560 nm was measured with a microplate reader. The cell viability observed in each treatment was expressed as a percentage of the control absorbance value. Since the MTT assay presents some limitations that can underestimated the anti-proliferative effects of extracts rich in polyphenols (Mosmann et al., 1983) before the analysis the cells were centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes, the supernatant discarded and the cells were resuspended in PBS buffer (Montagner et al., 2010). In addition blank was made to extract/fraction for each concentration.

## 2.6. Hemolysis assay

Peripheral blood samples were collected after 12 h of overnight fasting by venipuncture, using top Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA from volunteers previously genotyped by Ala16Val-SOD2 polymorphism (AA, VV, AV) as described in Montagner et al. (2010). The samples were spun in a refrigerated centrifuge at  $2500 \times g$  for 15 min to separate plasma, erythrocytes and leukocytes. Erythrocytes were washed three times in phosphate buffer isotonic saline (PBS), containing 22.2 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5.6 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 123.3 mmol/L NaCl, in distilled water (pH 7.4). Erythrocytes were then suspended in PBS at a cell density of  $10^8$ - $10^9$  cells/mL.

Hemolysis assay was adapted the Colomer et al. (2011). The *P. xanthogloea* extract and fractions were diluted in PBS (0.1% DMSO) at different concentrations, were placed in polystyrene eppendorfs tubes and the control group received an equal amount of DMSO. Aliquot of 25  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^9$  cell/mL) of erythrocyte suspension was added to each tube. The tubes were incubated at room temperature for 2 hours. Following incubation, the tubes were centrifuged (10 min at 3000 rpm). The concentration of hemoglobin indicates hemolysis was determined spectrophotometrically at 540 nm. The absorbance value of 100% hemolysis was determined by adding 25  $\mu\text{L}$  of erythrocytes to PBS containing 0.01% Triton X-100. The results obtained from untreated control group as well as *P. xanthogloea* extract/fractions

considering different Ala16Val SOD2 genotype are described as percent of hemolysis compared to erythrocytes exposed to Triton X-100. Therefore, lower values indicate protective effect as well as higher values indicates cytotoxic effect due to increase of erythrocyte lipoperoxidation membrane.

### 2.7. Statistical analysis

All results were expressed as percentage of control group, and statistically compared by One way analysis of variance followed by *post hoc* Dunnet or Tukey tests. A p value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## 3. Results

The prostate cancer cells treatment with doxorubicin was used as positive control to evaluate the antitumoral effect of *P. xanthogloea* extract and fractions (Fig. 1). As can see in Fig. 2, the *Pavonia* extract/fractions presented a significant cytotoxic effect against prostate cancer when compared to negative control group as well as positive group. However, the cytotoxic intensity was specific to extract and fractions.

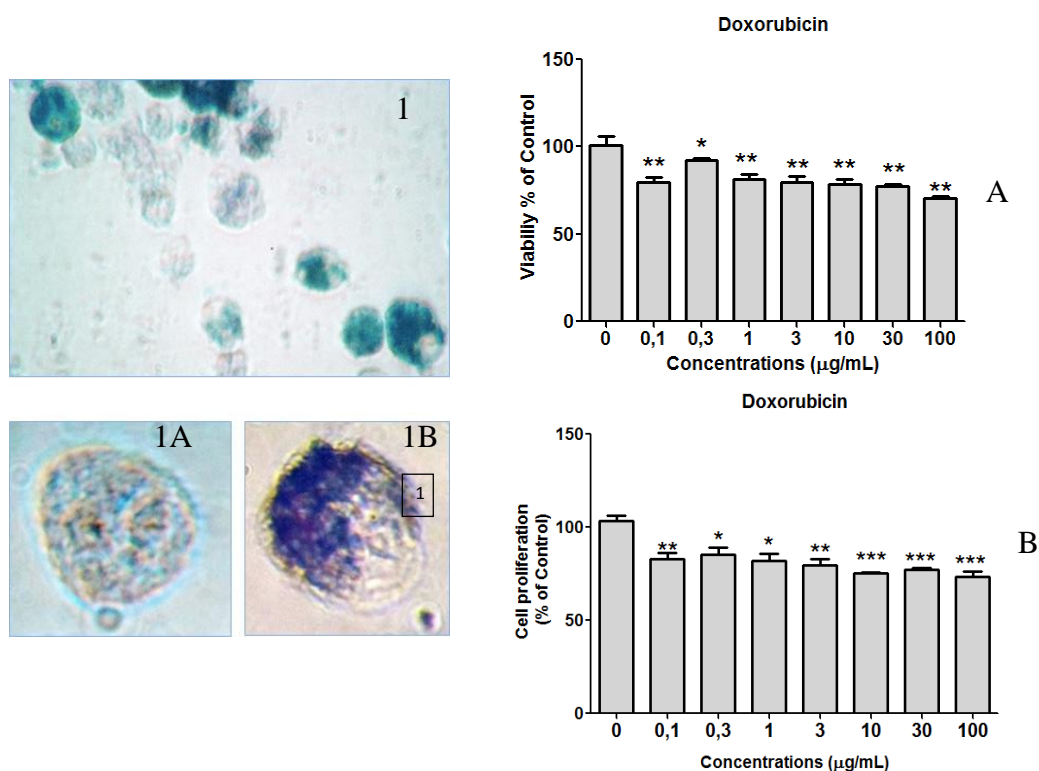


Fig. 1. Effect of different doxorubicin concentrations in DU 145 cells homogenates in comparison to control. A Cytotoxic effect (24 hours); B, antiproliferative effect (72 hours). Data show means  $\pm$  SE values. In A and B graphs, different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's post hoc test at  $p < 0.05$ . Cells DU 154 from MTT (1) and cell dead (2A) and cell life (B).

The *Pavonia* crude extract and hexane fractions showed a dose-dependent effect on prostate cancer viability. However, dichloromethane, aqueous and acetate fractions presented a hormetic effect, as its intermediary concentrations were more cytotoxic than lower and higher concentrations. The butanol was the fraction that presents lower cytotoxicity when compared to extract, other fractions as well as doxorubicin.

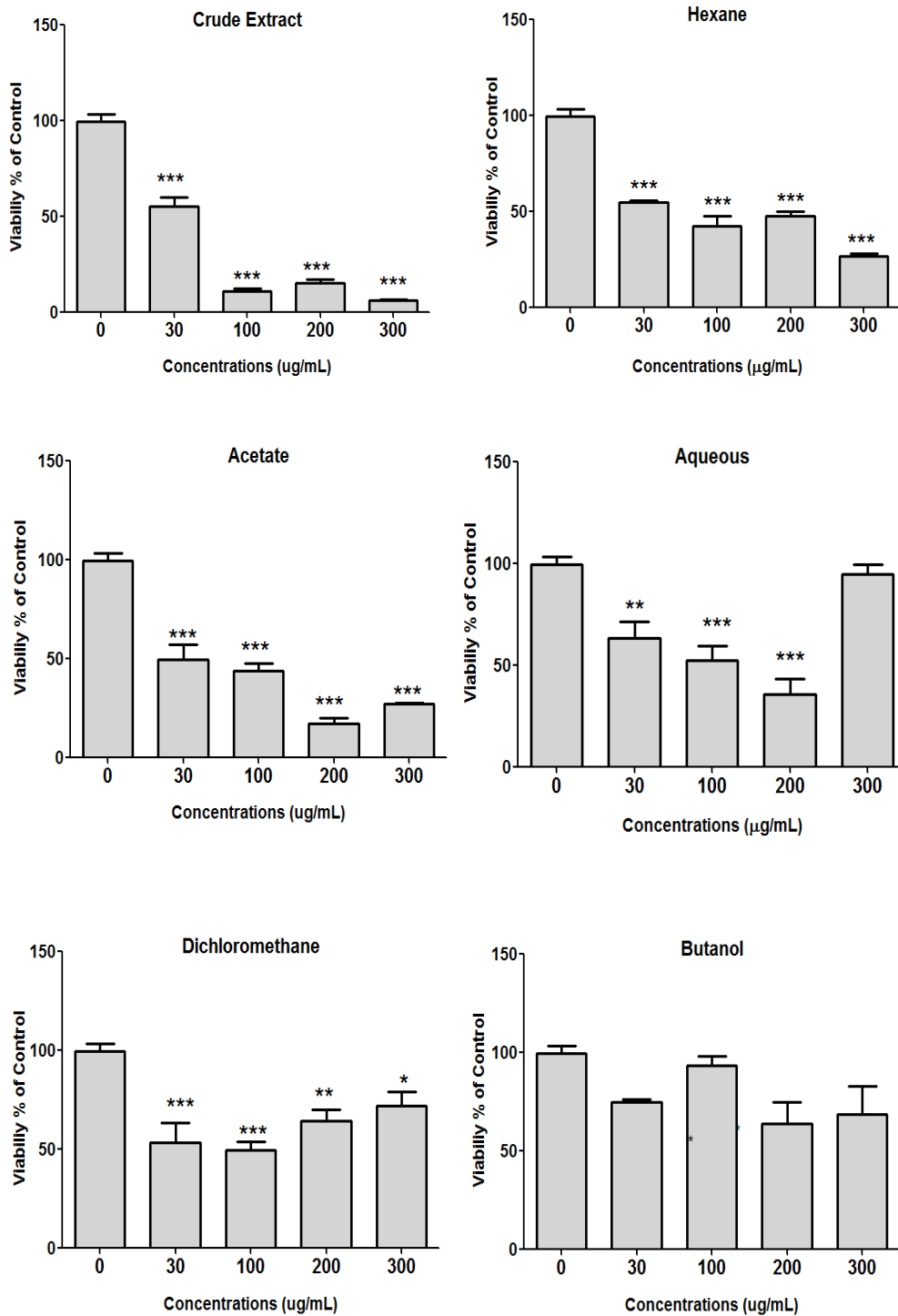


Fig. 2. Effect of different extract/fractions concentrations of *P. xanthogloea*, expositions for 24 hours, in DU 145 cells homogenates, in comparison to control. Data show means  $\pm$  SE values. In A and B graphs, different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses, followed by Tukey's post hoc test at  $p < 0.05$ .

The most important antitumoral property of some chemical molecule or extracts occurs in the cell proliferation. This action is generally evaluated after 72h of cancer cell exposition to chemotherapeutic as doxorubicin (Fig. 3). When this analysis was performed here, the results showed that antiproliferative effect of *P. xanthogloea* extract/fractions were different that effect on cell viability. The  $\geq 100$   $\mu\text{g/mL}$  concentration, the ethanolic extract decreased significantly the prostate cell growing in a dose-response way. Whereas the hexane, dichloromethane, aqueous extracts did not affect the prostate cancer proliferation the butanol presented an antiproliferative action from  $\geq 200$   $\mu\text{g/mL}$  concentration and acetate in the higher concentration (300  $\mu\text{g/mL}$ ). However, the butanol and acetate in lower dose presented a significant increase in cell proliferation, again indicating the occurrence of some hormetic effect.

The whole of results showed that *P. xanthogloea* crude extract presented similar cytotoxic and antiproliferative effects than doxorubicin when the 100  $\mu\text{g/mL}$  concentration where tested in both treatments. The ethyl-acetate and butanol extracts also decreasing the prostate cancer viability and cell proliferation, however this effect occurred in higher concentrations (200 and 300  $\mu\text{g/mL}$ ).

Considering that tiliroside was the main bioactive molecule observed in *P. xanthogloea*, this molecule was isolated and its contribution in the antitumoral properties of *P. xanthogloea* was investigated (Fig. 4). This molecule decreased significantly the prostate cancer viability and cell proliferation at 100  $\mu\text{g/mL}$  concentration. These results were similar to observed in cells exposed to doxorubicin. Therefore, the higher antitumoral crude extract effect can be consequence of tiliroside molecule to be present in all *P. xanthogloea* fractions.

The results presented in Fig. 5 showed that all *P. xanthogloea* extract/fractions decreased the hemolysis in comparison with untreated control group.

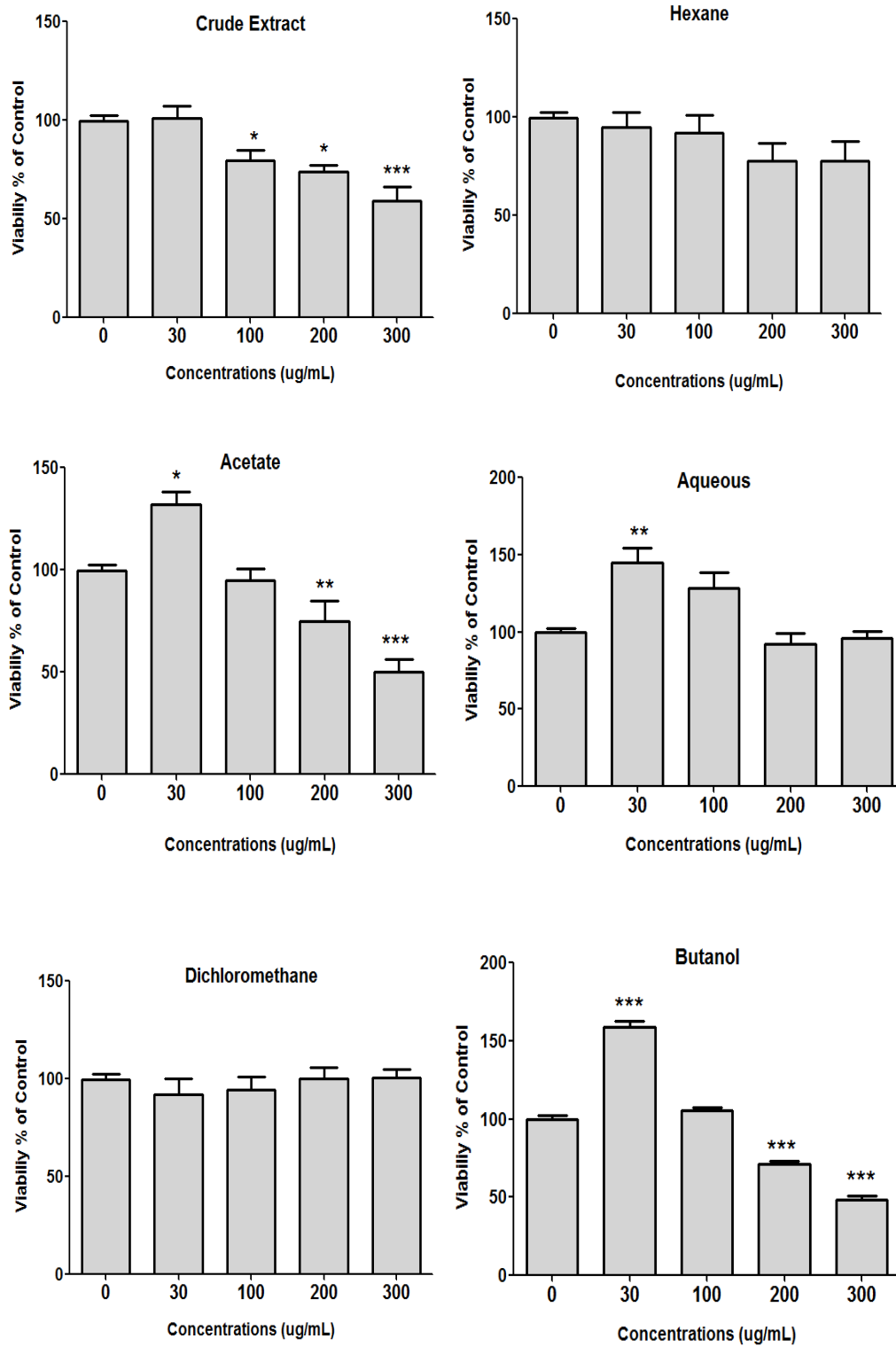


Fig. 3 Effect of different extract/fractions concentrations of *P. xanthogloea*, expositions for 72 hours, in DU 145 cells homogenates, in comparison to control. Data show means  $\pm$  SE values. In A and B graphs, different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses, followed by Tukey's post hoc test at  $p < 0.05$ .



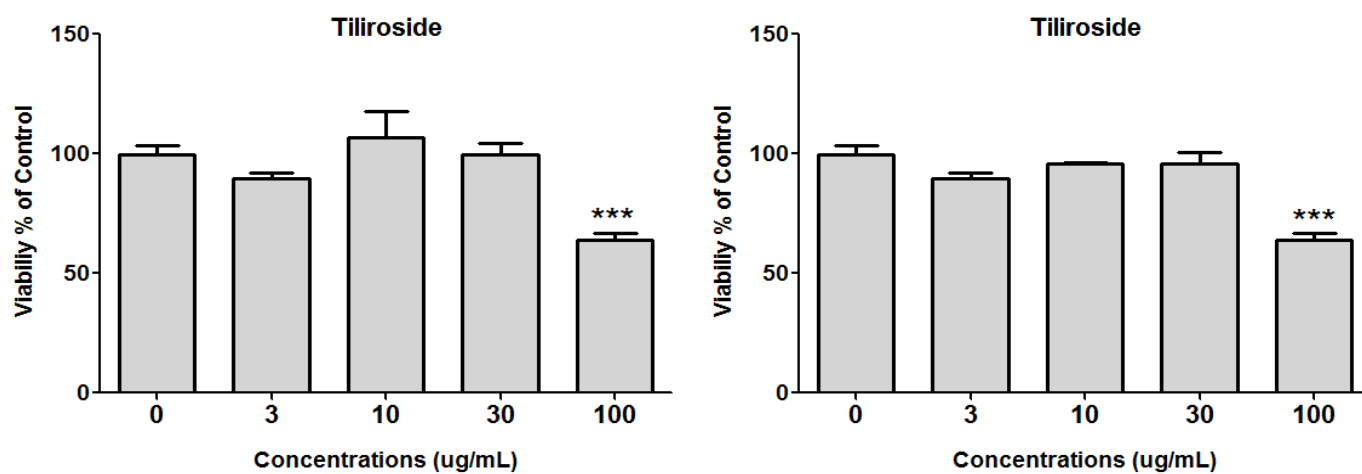


Fig.4. Effect of different tiliroside concentrations, expositions for 24 and 72 hours, in DU 145 cells homogenates, in comparison to control. Data show means  $\pm$  SE values. In A and B graphs, different letters indicate statistical differences by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's post hoc test at  $p < 0.05$ .

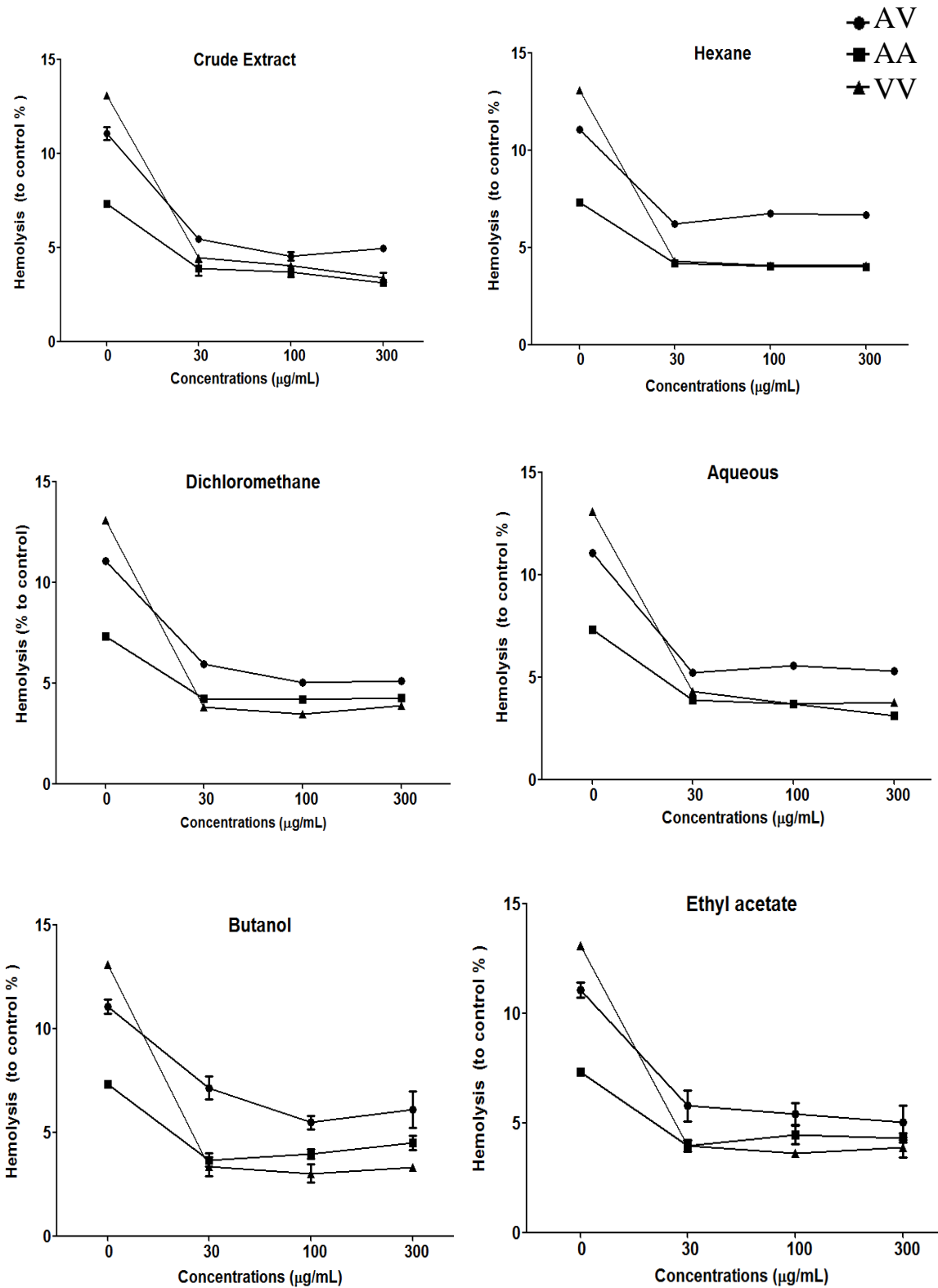


Fig. 5. Cytotoxic or protective effect due hemolysis. The *P. xanthogloea* extract and fractions and considering different Ala16Val SOD2 genotype, in different concentrations, in comparison with untreated control group.

#### 4. Discussão

Doxorubicin is an anti-cancer chemotherapy drug with cytotoxic effect against several prostate cancer and other neoplasia as breast, liver, multiple myeloma, neuroblastoma, ovary, sarcomas (Li et al., 2013), bladder (Yang et al., 2014), head and neck (Shimizu et al., 2013), leukemia (some types), lung, lymphomas (Lu et al., 2013), mesothelioma (Mirarabshahii et al., 2012), , pancreas (Yagublu et al., 2012), stomach (Zhang et al., 2011), testis (germ cell), thyroid (Denaro et al., 2013), uterus (Novetsky and Powell, 2013). Pharmacologically, doxorubicin is classified as an anthracycline antibiotic closely related to natural product named daunomycin. Similar to anthracyclines molecules, doxorubicin is an intercalating DNA and also inhibits macromolecular biosynthesis into the cells. During cell replication doxorubicin is able to induce broken in the DNA chain for replication interrupting the mitosis cycle. The DNA intercalation also can produce DNA damage and apoptosis induction as well as deregulate the epigenomic and transcriptome cells (Weiss, 1992; Pang et al., 2013). In addition there are studies reporting doxorubicin antimalarial activity as investigation performed by Friedman and Caflisch (2009).

The present data did not permit to infer about *P. xanthogloea* mechanism of action on prostate cancer cells, and this point need to be clarify in future investigations. However, there are investigations published in the literature describing antimicrobial, antimalarial activity of some Malvaceae species such as studies performed by Konaté et al. (2013) and Beha et al. (2004) and antitumoral effect against prostate cancer as described by Da Silva et al. (2012). These studies support the inference that *P. xanthogloea* effects on prostate cancer are realistic and also can involve some mechanism of action similar to observed in doxorubicin drug.

Generally, drugs with antitumoral effect present high toxicity in the body, as doxorubicin which despite its high efficacy is highly cardiotoxic. Studies as performed by Yang et al (2012) suggested that negative effect of doxorubicin is associated with increase in cell oxidative stress.

Therefore, an additional assay was performed to evaluate the potential cytotoxic effect of *P. xanthogloea* extract/fractions on human erythrocyte was evaluated at three concentrations: 30, 100 and 300 µg/mL. These concentrations were choose because the better biological activity against prostate cancer for *P. xanthogloea* extract and all fractions were obtained when the cells were exposed at 100 and 300 µg/mL concentrations. As *P. xanthogloea* cytotoxicity screening was performed using erythrocyte human cells, and these cells obtained from different subjects can present genetic variables which have some

influence on response, to perform the hemolysis assay the genotype of donors to Ala16Val-SOD2 polymorphism was considered in the analysis.

The results presented in Fig. 5 showed that all *P. xanthogloea* extract/fractions decreased the lipoperoxidation evaluated by hemolysis in comparison with untreated control group. These results indicate some antioxidant *P. xanthogloea* activity in the concentrations tested here. Despite the hemolysis to be higher in V- allele erythrocytes carriers (VV and AV genotypes) than AA genotype in the untreated cells, the antioxidant protective effect of *P. xanthogloea* extract/fractions against hemolysis was independent of SOD2 genetic variation.

Genetic risk prediction uses genetic data to individualize prediction of outcome or effect from a known harmful toxicant. Several examples of toxicogenetics (usually binary traits) have been described in the literature (Nebert et al., 2013). However, most studies tested pharmacogenetic and toxicogenetic effects only in advanced research (pre-clinical and clinical studies).

The introduction of pharmacogenetic and/or toxicogenetic analysis in screening *in vitro* investigations could help to evaluate if some chemical or phytotherapeutic response is affected by genetic variations of cell metabolic pathways where the bioactive molecules act. As described in the review performed by Bresciani et al (2013) several studies showed that variations in human SOD2 gene, more specifically the Ala16Val polymorphism is associated to increase in risk of several diseases including prostate cancer. Investigations considering the potential Ala16Val-SOD2 *in vitro* response to pollutant agents and medicinal drugs were also performed and the results showed influence of this polymorphism in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) exposed to UV radiation (Montagner et al., 2010), methyl-mercury (Algarve et al., 2013). The antioxidant response to clomiphene citrate, a drug using in woman reproductive medicine was also influenced by this polymorphism (Costa et al., 2012). The Ala16Val-SOD2 also has an *in vitro* influence on hepatocytes enzymatic activity (Martin et al., 2011) and inflammatory cytokines production (Montano et al., 2012). Despite the red blood cells did not present nucleus and mitochondria, and therefore did not produce SOD2 enzyme, recently, Mostardeiro et al (2014b) described the influence of this polymorphism in erythrocytes hemolysis with and without exposition to chelerythrine which is a protein kinase inhibitor causing that affect the membrane quality of these cells.

Considering that erythrocytes are easily obtained and the hemolysis analysis is a good assay because these cells are highly sensible to oxidative stress that can be caused by some drug or plant extract, the presented study introduced in the analysis of *P. xanthogloea* effect

on erythrocytes the evaluation of potential toxicogenetic response associated to Ala16Val-SOD2 genes.

## 5. Conclusions

From these data is possible to suggest that *P. xanthogloea* presents antitumoral effect against prostate cancer, as indicated by popular use. This effect is probably related to high tiliroside concentration found in this plant. The data also showed that effective concentrations of *P. xanthogloea* crude extract, ethyl-acetate and butanol (100 to 300 µg/mL) did not present cytotoxic effect on human erythrocyte cells. This study support conducting additional investigations to determine causal mechanisms as well as *in vivo* effect of *P. xanthogloea* on prostate cancer.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - n° 300969/2009-0 and 471233/2007-2), Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - n° 10/0029-0), and Coordenação de Aperfeiçoamento e Pesquisa.

## References

Abd Ghafar, S. A. et al., 2013. Cytotoxic Activity of Kenaf Seed Oils from Supercritical Carbon Dioxide Fluid Extraction towards Human Colorectal Cancer (HT29) Cell Lines.

**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013: 549705, doi:

10.1155/2013/549705

Algarve, T.D., et al. 2013. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Research**, 12 (4): 5134-5144.

Andrade, T.U. de, Ewald, B.T., Freitas, P.R., et al., 2012. *Pavonia alnifolia* a. St. Hil.: in vivo hypotensive effect and in vitro ace inhibitory activity. **Int J Pharm Pharm Sci**, 4(1), 124-126.

Basu, S.K., Rupeshkumar, M., Kavitha, K., 2012. Hepatoprotective and antioxidant effect of *Pavonia zeylanica* against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Int J Pharm Bio Sci*, 3(1), 407-415.

Beha, E. et al., 2004. Antimalarial activity of extracts of *Abutilon grandiflorum* G. Don - a traditional Tanzanian medicinal plant. *Phytotherapy Research*, 18(3):236-40.

Boer, H.J. de, Koola, A., Broberg, A., et al., 2005. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal Ethnopharmacology*, 96: 461–469, doi:10.1016/j.jep.2004.09.035

Boldrini, I.I., 1997. Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização Fisionômica e Problemática Ocupacional. *Boletim do Instituto de Biociências: Ecologia*, 56: 1-33.

Bresciani, G., et al., 2013. The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to Human Diseases and Interaction with Environmental Factors. *Free Radical Research*, 47:781-792.

Bresciani, G., González-Gallego, J., da Cruz, I. B., de Paz, J. A., Cuevas, M. J., 2013. The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. *Clinical Biochemistry*, 46(4–5):335–340 <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.11.020>

Chari, V. M., Jordan, M., Wagner, H., 1978. Structure elucidation and synthesis of naturally occurring acylglycosides. *Planta Medica*, 34: 93-96.

Choi, E.S. et al., 2012. *Althaea rosea* Cavanil and *Plantago major* L. suppress neoplastic cell transformation through the inhibition of epidermal growth factor receptor kinase. *Molecular Medicine Reports*, 6(4): 843-7.

Colomer, A. et al., 2011. Cationic Surfactants Derived from Lysine: Effects of Their Structure and Charge Type on Antimicrobial and Hemolytic Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(4):989–1002.

Cornelius, M.T.F., et al., 2004. Solasonina e flavonóides isolados de *Solanum crinitum* Lam. *Revista Brasileira de Farmácia*, 85(2): 57-59.

Costa, F., et al., 2012. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online**, 24 (4): 474–81.

Da Silva, D. A. et al., 2012. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). **Natural Product Research**, 26(4): 364-9, doi: 10.1080/14786411003752102

Dai, Y. et al., 2012. Isolation and synthesis of two antiproliferative calamenene-type sesquiterpenoids from *Sterculia tavia* from the Madagascar rain forest. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15, 20(24):6940-42.

Denaro, N. et al., 2013. The role of chemotherapy and latest emerging target therapies in anaplastic thyroid cancer. **OncoTargets and Therapy**, 6: 1231–1241.

Friedman, R., Caflisch, A., 2009. Discovery of Plasmepsin Inhibitors by Fragment-Based Docking and Consensus Scoring. **Chem Med Chem**, 4 (8): 1317–26.  
doi:10.1002/cmdc.200900078.

Garcia, C.M., 2007. Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Pavonia distinguenda* A.St.-Hill. et Naudin e *Dorstenia brasiliensis* Lam. Santa Maria, RS: UFSM, 186p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria.

Grings, M., Krapovickas, A., Boldrini, I.I., 2011. A new species of *Pavonia* (Malvaceae) from southern Brazil. **Systematic Botany**, 36(2): 419-423.

Gul, M.Z. et al., 2011. Evaluation of *Abelmoschus moschatus* extracts for antioxidant, free radical scavenging, antimicrobial and antiproliferative activities using in vitro assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 17(11): 64.

Hou, D.X. et al., 2005. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1, 440(1):101-9.

- Kalarani, D.H., Dinakar, A., Senthilkumar, N., 2012. Analgesic and anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of *Alangium salvifolium* and *Pavonia zeylanica*. **Int J Pharm Sci Rev Res**, 17(1), 77-80.
- Konaté, K., Zerbo, P., Ouédraogo, 2013. M. Anti-nociceptive properties in rodents and the possibility of using Polyphenol-rich fractions from *Sida urens* L. (Malvaceae) against of dental caries Bacteria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 21, 12(1): 14.
- Kumari, A. et al., 2011. Anti-inflammatory and Antinociceptive activity of *Pavonia zeylanica* Linn. **Asian J Res Pharm Sci**, 1(4): 113-116.
- Li, J. et al., 2013. Recent advances in delivery of drug–nucleic acid combinations for cancer treatment. **Journal of Controlled Release**, 172: 589–600.
- Li, M.Y. et al., 2013. 3-O-methylthespesilactam, a new small-molecule anticancer pan-JAK inhibitor against A2058 human melanoma cells. **Biochemical Pharmacologic**, 15, 86(10): 1411-8.
- Lin, H.H. et al., 2007. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. **Chemico-Biological Interactions**, 5,165(1): 59-75.
- Lu, J., Shi, Z., Xu, H., 2013. The mitochondrial cyclophilin D/p53 complexation mediates doxorubicin-induced non-apoptotic death of A549 lung cancer cells. **Mol Cell Biochem**, Published online, DOI 10.1007/s11010-013-1922-1
- Lupatini, M. et al., 2013. Soil-Borne Bacterial Structure and Diversity Does Not Reflect Community Activity in Pampa Biome. **Plos One**, 8(10): e76465.  
doi:10.1371/journal.pone.0076465
- Martin, F.M. et al., 2011. SOD2 deficient erythroid cells up-regulate transferrin receptor and down-regulate mitochondrial biogenesis and metabolism. **Plos One**, 6(2): e16894.
- Mirarabshahii, P. et al., 2012. Diffuse malignant peritoneal mesothelioma – An update on treatment. **Cancer Treatment Reviews**, 38: 605–612.



Montagner, G.F. Dos S. et al., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**, 24:1410-16.

Montano, M.A.E., et al., 2012. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, 60(1): 30-3.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Met**, 65, 55-63.

Mostardeiro, C.P. et al., 2014a. The human ALA16VAL Sod2 polymorphism influence erythrocyte hemolysis exposed to a protein kinase c inhibitor. **Cell Biology and Toxicology**,

Mostardeiro, C.P. et al., 2014b. The *Pavonia xanthogloea* (Ekman, Malvaceae): phenolic compounds quantification, antioxidant and citotoxic effect on human lymphocytes cells. **Pharmacognosy Magazine**,

Nakhare, S. and Garg, S.C., 1992. Antimicrobial activity of the essential oil of *Pavonia odorata* Willd. **Ancient Science of Life**, XII(1 - 2): 227 – 230.

Nebert, D.W., Zhang, G., Vesell, E.S., 2013. Genetic risk prediction: individualized variability in susceptibility to toxicants. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 53:355-75.

Novetsky, A.P., Powell, M.A., 2013. Management of sarcomas of the uterus. **Curr Opin Oncol**, 25(5):546-52, doi: 10.1097/CCO.0b013e328363e0ef.

Pang, B. et al., 2013. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. **Nature Communications**, 4: 1908.

doi:10.1038/ncomms2921

Roesch, L.F.W. et al., 2009. The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. **Diversity**, 1: 182-98.

Sharma, P., Sharma, J.D., 2001. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal Ethnopharmacology**, 74(3), 239-43.

Sharma, S.; Khan, N.; Sultana, S., 2004. Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by *Hibiscus rosa sinensis* extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice. **European Journal of Cancer Prevention**, 13(1):53-63.

Shimizu, N. et al., 2013. Selective enhancing effect of early mitotic inhibitor 1 (Emi1) depletion on the sensitivity of doxorubicin or X-ray treatment in human cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(24):17238–17252.

Still, P.C. et al., 2013. Alkaloids from *Microcos paniculata* with cytotoxic and nicotinic receptor antagonistic activities. **Journal of Natural Products**, 22, 76(2):243-9.

Tsimplouli, C., Demetzos, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Pantazis, P., Dimas, K., 2012. In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. *Eur J Nutr*, 51(2), 181-90.

Vahitha, R. et al., 2002. Larvicidal efficacy of *Pavonia zeylanica* L. and *Acacia ferruginea* D.C. against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource Technology**, 82 (2): 203-4.

Weiss, R.B., 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Seminars in Oncology**, 19 (6): 670–86.

Yagublu, V. et al., 2012. Treatment of experimental pancreatic cancer by doxorubicin-, mitoxantrone-, and irinotecan-drug eluting beads. **Pancreatology**, 13(1):79-87, doi: 10.1016/j.pan.2012.11.305

Yang, J. et al., 2014. N1-guanyl-1,7-diaminoheptane sensitizes bladder cancer cells to doxorubicin by preventing epithelial–mesenchymal transition through inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2 activation. **Cancer Science**, 2014:1-9, doi: 10.1111/cas.12328 1-9

Yang, M.Y. et al., 2010. The hypolipidemic effect of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 27,58(2):850-9.

Zhang, X. et al., 2011. Alpha-tocopheryl succinate enhances doxorubicin-induced apoptosis in human gastric cancer cells via promotion of doxorubicin influx and suppression of doxorubicin efflux. **Cancer Letters**, 307: 174–181, doi: 10.1016/j.canlet.2011.04.001



## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram descritas as propriedades farmacológicas da espécie *P. xanthogloea*, que no Rio Grande do Sul é popularmente conhecida como “erva de ovelha”, utilizada como antimicrobiana e no tratamento do câncer de próstata. Os resultados mostraram a presença de moléculas bioativas, capacidade e atividade antioxidante bem como atividade antiproliferativa e citotóxica em células tumorais de câncer de próstata. Portanto, tais resultados corroboram o uso tradicional da planta pela população. A partir da revisão da literatura pode-se afirmar que este é o primeiro estudo que descreve propriedades biológicas na espécie *P.xanthogloea*. Este também é um dos primeiros estudos que descreve estas características em plantas do gênero *Pavonia*.

O estudo das propriedades farmacológicas das plantas tem como objetivo principal a identificação e desenvolvimento de novos fármacos que curem, controlem ou aliviem os sintomas das doenças ou que tenham propriedades preventivas ou diagnósticas. Acredita-se que no Brasil existam cerca de 120 mil espécies com potencial farmacológico, entretanto apenas 10% das mesmas estão sendo cientificamente investigadas (DI STASI; HIMURA-LIMA, 2002).

Uma vez que o Bioma Pampa foi reconhecido há pouco tempo como região que contém peculiaridades e grande biodiversidade (ROESCH et al., 2009) o estudo das potenciais plantas medicinais deste Bioma é ainda bastante escasso e deve ser incentivado. Por este motivo a identificação de plantas utilizadas pela população gaúcha que vive no Pampa e representa uma mescla étnica principalmente entre os povos indígenas pré-colombianos, espanhóis e portugueses é de grande relevância.

Uma determinada planta ou molécula para ser farmacologicamente utilizada tem que cumprir dois objetivos: ser eficaz e segura (GILMAN, 1996). Por este motivo, estudos exploratórios sobre propriedades de plantas popularmente utilizadas não devem se limitar apenas a identificação das atividades farmacológicas destas espécies, mas sim realizar preferencialmente investigações concomitantes sobre potenciais efeitos toxicológicos das mesmas.

Dada a inexistência de estudos prévios sobre as propriedades farmacológicas da *P. xanthogloea*, foi realizado um levantamento quimiotaxônomico de efeitos antioxidantes e antitumorais de espécies da Família Malvaceae. A síntese dos resultados obtidos que está na

Tabela 1, que em adição ao relato de uso popular indicou a ocorrência de propriedades antioxidantes e antitumorais na espécie aqui estudada. Uma vez que a atividade antioxidante é uma propriedade de plantas que age sistemicamente, ou seja, possuem diversas propriedades e aplicações farmacológicas, a identificação inicial do efeito antioxidante de *P. xanthogloea* é justificada. A seguir os resultados obtidos são comentados em maior detalhe.

Nas moléculas bioativas avaliadas no extrato e frações de *P. xanthogloea* a mais frequente e em maior concentração foi o tilirosídeo, um flavonóide glicosilado que está presente em várias plantas medicinais ou mesmo em frutos consumidos na dieta humana como é o caso do moranguinho (TSUKAMOTO et al., 2004). Apesar de ser encontrado em muitas plantas o tilirosídeo é menos estudado que outras moléculas como a catequina e a quercetina. Entretanto, os estudos prévios sugerem que esta molécula possua diversas atividades biológicas incluindo atividade antioxidante e antitumoral (SALA et al., 2003; TSIMPLOULI et al., 2012). Assim, provavelmente esta molécula contribuiu para as propriedades farmacológicas encontradas no extrato e frações da *P. xanthogloea*. Também é interessante comentar que na fração n-butanol foi detectada alta concentração de quercetrina que é a forma glicosilada da quercetina, bem como ácido gálico e ácido clorogênico. Estes resultados estão em consonância com o tipo de molécula que geralmente é extraída no solvente n-butanol que inclui flavonóides e cumarinas. Estas moléculas também são extraídas na fração acetato de etila (MEIRELES, 2009).

A análise da atividade antioxidante em cultura de linfócitos humanos com e sem exposição ao SNP mostrou resultados dependentes do extrato ou frações da *P. xanthogloea*. O extrato cru não causou modificação na viabilidade celular, e ao contrário, na presença de SNP aumentou a viabilidade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Somente na concentração de 300 µg/mL do extrato e do SNP é que foi observada citotoxicidade. Já as frações hexano e acetato de etila além de não serem citotóxicas, as mesmas reverteram a citotoxicidade causada pelo SNP em todas as concentrações testadas. Já a fração diclorometano foi citotóxica tanto isolada quanto na presença de SNP em todas as concentrações testadas.

O diclorometano é um organoclorado imiscível em água que dissolve a maioria dos solventes orgânicos tendo a capacidade de extrair éteres, ésteres, sulfetos, sulfóxidos, tióis, hidroxilas, halogênios, aldeídos, cetonas, e também glicosídeos cardiotônicos (MEIRELES, 2009). Como o diclorometano extrai um amplo conjunto de substâncias, existe a probabilidade da ocorrência de algum tipo de molécula citotóxica nesta fração presente em *P. xanthogloea*.

Os resultados obtidos no primeiro estudo apresentado no Artigo 1 sugeriram, portanto a ocorrência de efeitos antioxidantes no extrato e na maioria das frações da *P. xanthogloea* que serviu como subsídio para o estudo subsequente no qual foi avaliado o efeito antitumoral contra o câncer de próstata.

Entretanto, antes da realização desta investigação, considerando que a citotoxicidade pode ser geneticamente influenciada foi conduzida uma investigação sobre a potencial resposta diferencial a hemólise de eritrócitos portadores de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2. A relevância deste estudo está relacionada ao crescente número de pesquisas e evidências que sugerem influência genética tanto na resposta a fármacos quanto a agentes tóxicos em ramos científicos agora conhecidos como farmacogenética e toxicogenética (RUSYIN et al., 2010, TAUSER, 2012).

Assim, considerando que existe um vasto número de estudos envolvendo a detecção da atividade antioxidante de plantas medicinais, a averiguação do quanto o polimorfismo genético Ala16Val-SOD2, que tem sido associados a doenças crônicas (BRESCIANI et al., 2013), influenciariam os ensaios *in vitro* que utilizam células humanas, podem ser considerados relevantes.

Um ensaio bastante utilizado é a influência de moléculas e extratos sobre a hemólise de eritrócitos. Por este motivo, ainda que eritrócitos sejam anucleados, investigações prévias sugeriam que a deficiência da SOD2 poderia alterar a suscetibilidade dos eritrócitos a agentes hemolisantes. Assim, o segundo estudo realizado neste trabalho e apresentado no Artigo 2 teve como objetivo averiguar se a hemólise causada pela exposição a queleritrina (CHE), que é uma molécula que diminui a permeabilidade da hemácia, era influenciada pelos diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

Os resultados mostraram que, na ausência da CHE eritrócitos AA apresentavam baixos níveis de hemólise e de indicadores de estresse oxidativo como a AOPP e NO quando comparados ao genótipo VV. Entretanto, quando os eritrócitos foram tratados com CHE este resultado se alterou. No caso, eritrócitos AA apresentaram alta taxa de hemólise do que os portadores do genótipo VV. Os resultados deste estudo indicaram a relevância de se considerar polimorfismos, como o Ala16Val-SOD2, em ensaios *in vitro* com eritrócitos. Por este motivo, no terceiro estudo apresentado no Artigo 3 além da atividade antitumoral contra câncer de próstata também foi feito um estudo de citotoxicidade utilizando o ensaio da hemólise com eritrócitos oriundos de portadores de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

Os resultados apresentados na Figura 4 do Artigo 3 mostraram que as diferentes concentrações do extrato e frações da *P. xanthogloea* diminuíram significativamente a taxa de hemólise quando comparada com o grupo não tratado indicando ação antioxidante. Nestas condições o efeito da *P. xanthogloea* sobre a hemólise não foi influenciado pelos genótipos da Ala16Val-SOD2. Estes resultados indicam que os extratos e frações da planta estudada não são citotóxicos para eritrócitos nas concentrações testadas.

O conjunto dos estudos realizados oportunizou a análise do potencial efeito antitumoral contra câncer de próstata do extrato e frações da *P. xanthogloea* utilizando a linhagem comercial DU145. Os resultados foram promissores uma vez que foi observada diminuição na taxa de viabilidade e proliferação celular similar às células tratadas com o quimioterápico doxorrubicina.

Entretanto, os resultados atuais não permitem inferir sobre o mecanismo de ação da *P. xanthogloea* em células de câncer de próstata, e este ponto precisa ser esclarecido em futuras investigações. No entanto, há investigações publicadas na literatura descrevendo a atividade antimicrobiana e antimalárica de algumas espécies, tais como Malvaceae (KONATÉ et al., 2013; BEFHA et al., 2004), e efeito anti-tumoral contra o câncer da próstata (DA SILVA et al., 2012). Estes estudos suportam a conclusão de que os efeitos *P. xanthogloea* sobre o câncer de próstata são realistas e também pode envolver um mecanismo de ação semelhante ao observado no fármaco doxorrubicina. Apesar de ser uma investigação inicial e exploratória, o conjunto dos resultados corrobora o uso popular da *P. xanthogloea* como fitoterápico em relação a terapia do câncer de próstata.

Por fim é importante comentar as limitações metodológicas associadas ao presente estudo. Entre estas se destaca a não realização de ensaios sobre os mecanismos causais relacionados ao potencial efeito antitumoral da *P. xanthogloea* contra o câncer de próstata. Além disto, são necessários estudos adicionais que avaliem o impacto da SOD2 na produção de eritrócitos a partir de análises de células-tronco presentes na medula. Entretanto, todos estes estudos poderão ser futuramente conduzidos sem prejuízo ao trabalho aqui apresentado.



## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo buscou identificar compostos bioativos presentes no extrato e frações de *P. xanthogloea* avaliando a sua ação antioxidante, antitumoral e também o potencial efeito citotóxico, via estudos farmacogenéticos em hemácias humanas portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

O extrato e frações mostraram a presença de compostos polifenólicos com destaque aos níveis elevados de tilirosídeo principalmente nas frações acetato de etila e água;

O extrato e frações de *P. xanthogloea* apresentaram atividade antioxidante dependente da concentração em linfócitos humanos expostos ao SNP que produz altos níveis de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com exceção da fração diclorometano. Esta fração foi citotóxica aos linfócitos;

Estudo do padrão de hemólise associado aos diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 foram conduzidos sugerindo efeito farmacogenético. Entretanto, quando foi realizado ensaio de hemólise para diferentes concentrações do extrato e frações de *P. xanthogloea* o efeito antihemolítico observado foi independente do gene da SOD2;

Atividade citotóxica e antiproliferativa foram observadas na linhagem celular de câncer de próstata DU145 dependente do tipo de extrato/fração e concentração. Apesar da fração butanol não apresentar um claro efeito citotóxico, a mesma induziu inibição proliferativa.

Os resultados obtidos da atividade antitumoral guardaram similaridades ao quimioterápico doxorrubicina e também parecem estar associados ao tilirosídeo isolado da *P. xanthogloea*.

O conjunto dos resultados corrobora o uso popular da *P. xanthogloea* em relação a terapia do câncer de próstata. Entretanto, investigações complementares devem ser feitas para avaliar os mecanismos causais antitumorais da *P. xanthogloea*.



## REFERÊNCIAS

ABD GHAFAR, S. A. et al. Cytotoxic Activity of Kenaf Seed Oils from Supercritical Carbon Dioxide Fluid Extraction towards Human Colorectal Cancer (HT29) Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. n. 549705, 2013. doi: 10.1155/2013/549705.

ACHARYA, J .et al. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **European Journal of Haematology**, v. 47, n. 4, p. 287-91, 1991.

AFANAS'EV, I.Superoxide and nitric oxide in senescence and aging. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 14, p. 3899-912, 2009.

ALARCON-AGUILAR F. J. ET AL. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, n. 1, p. 66-71, 2007.

ALARCÓN-ALONSO, J.et al. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 751-6, 2012.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, Supl, p. 678-689, 2006.

ALCINDOR, T.;BRIDGES, K.R. Sideroblastic anaemias. **British journal of haematology**, v. 116, n. 4, p. 733-43, 2002.

ALFADDA, A.A.; SALLAM, R.M. Reactive oxygen species in health and disease. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

AMITAI, Y. Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. **Glia**, v. 58, n. 15, p. 1775-81, 2010.

AN, Y.et al. Inhibitory effects of flavonoids from *Abelmoschus manihot* flowers on triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes. **Fitoterapia**. v. 82, n. 4, p. 595-600, 2011.

ARANDA, E. et al.. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 50-67, 2012.

BANZOUZI J. T. et al. Studies on medicinal plants of Ivory Coast: investigation of *Sida acuta* for in vitro antiplasmodial activities and identification of an active constituent. **Phytomedicine**.v. 11, n. 4, p. 338-41, 2004.

BARNES, J. Pharmacovigilance of herbal medicines : a UK perspective. **Drug Safety**, v.26, n. 12, p. 829-51, 2003.

BEHA, E. et al. Antimalarial activity of extracts of *Abutilon grandiflorum* G. Don - a traditional Tanzanian medicinal plant. **Phytotherapy Research**. v18(3):236-40, 2004.

BERG, R.M.; MØLLER, K.; BAILEY, D.M. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 7, p.1532-44, 2011.

BICA, C.G. et al. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 196, n.2, p. 153-8, 2010.

BINDHU, M. R; UMADEVI, M. Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using *Hibiscus cannabinus* leaf extract and its antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 15, n. 101, p. 184-90, 2013.

BJELAKOVIC, G. et al. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 14, n. 3, p. CD007176, 2012.

BLESSON, S. et al. Analysis of the mechanisms of human cytotoxic T lymphocyte response inhibition by NO. **International Immunology**, v. 14, n. 10, p. 1169-78, 2002.

BOLDRINI, I.I. et al. Aspectos florísticos e ecológicos da vegetação campestre do Morro da Polícia, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 12, n.1, p. 89-100, 1998.

BOURICHE, H. et al. Anti-inflammatory, free radical-scavenging, and metal-chelating activities of *Malva parviflora*. **Pharmaceutical Biology**. v. 49, n. 9, p. 942-6, 2011.

BOVINI, M.G.; ESTEVES, G & DUARTE, M.C. Malvaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**. v.47, n. 10, p. 781-92, 2013.

BUENO, O.L. Flora Fanerogâmica da Reserva Biológica do Ibicuí-Mirim, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Malvaceae. **Iheringia, Série Botânica**. v. 46, p. 3-20, 1995.

BUENO, O.L.; KRAPOVICKAS, A. Malvaceae – novas ocorrências para o Rio Grande do Sul e Brasil. **Iheringia, Série Botânica**. v. 44, p. 3-14, 1994.

BUTLER, A.R.; MEGSON, I.L. Non-heme iron nitrosyls in biology. **Chemical Review**, v. 102, n. 4, p. 1155-66, 2002.

CABALLERO-GEORGE C. et al. In vitro inhibition of [3H]-angiotensin II binding on the human AT1 receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* bark. **Planta Medica**. v.68, n. 12, p. 1066-71, 2002.

CHANG YC, et al. *Hibiscus anthocyanins* rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 15,n. 205(3), p. 201-12, 2005.

CHANG, H.S. et al. Cytotoxic cardenolide glycosides from the root of *Reevesia formosana*. **Phytochemistry**. v. 87, p. 86-95, 2013.

CHENG X. P. et al. Inhibitory effect of total flavone of *Abelmoschus manihot L.* Medic on NMDA receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons. **Neuroscience research**. v. 55, n. 2, p. 142-5, 2006.

CHENG, Y. L. et al. The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 36, n. 1, p. 171-84, 2008.

CHIU, D.; LUBIN, B.; SHOHET, S.B. Peroxidative reactions in red cell biology. In: PRYOR, W.A. (Ed.). **Free Radicals in Biology**. New York: Academic Press, 1982, 115–160.

CHOI, E.S. et al. *Althaea rosea Cavanil* and *Plantago major L.* suppress neoplastic cell transformation through the inhibition of epidermal growth factor receptor kinase. **Molecular Medicine Reports**. v. 6, n. 4, p. 843-7, 2012.

CLARKE, M.J.; GAUL, J. B. Chemistry relevant to the biological effects of nitric oxide and metallonitrosyls. **Structures and Biological Effects: Structure and Bonding**. 1993. v. 81, p.147-81.

COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 24, n. 4, p. 474–81, 2012.

COUTINHO, L. M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 1, p. 17-23, 1978.

COX, D.G.; TAMIMI, R.M.; HUNTER, D.J. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. **BMC Cancer**, v. 31, n. 6, p. 217, 2006.

CRAG, G. M.; NEWMANN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CURRY, S.C.; ARNOLD-CAPELL, P. Toxic effects of drugs used in the ICU. Nitroprusside, nitroglycerin, and angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Critical Care Clinics**, v. 7, n. 3, p. 555-81, 1991.

DA SILVA, D. A. et al. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). **Natural Product Research**. v.26, n. 4, p. 364-9, 2012.

DAI, Y. et al. Isolation and synthesis of two antiproliferative calamenene-type sesquiterpenoids from *Sterculia tavia* from the Madagascar rain forest. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v :15, n. 20(24), p. 6940-4, 2012.

DARCANSOY, İ. Ö. et al. *Corchorus olitorius* (jute) extract induced cytotoxicity and genotoxicity on human multiple myeloma cells (ARH-77). **Pharmaceutical Biology**. v. 51 n. 6, p. 766-70, 2013.

DATUSALIA, A. K.; DORA. C.P.; SHARMA.S. Acute and chronic hypoglycemic activity of *Sida tiagii* fruits in N5-streptozotocin diabetic rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 69, n. 4, p. 699-706, 2012.

DE ABREU GONZAGA W. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med**. v. 69, n. 8, p. 773-5, 2003.

DE BOER, H.J. et al. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n. 3, p. 461-9, 2005.

DI STASI, L.C.; HIMURA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002.

DOLAN, M.E. et al. Heritability and linkage analysis of sensitivity to cisplatin-induced cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 64, p. 4353–6, 2004.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**. v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUARTE, M.M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 3, n. 13-14, p. 1118-23, 2010.

EINARSON, T.R. Drug-related hospital admissions. **The Annals of Pharmacotherapy**. v. 27, n. 7/8, p. 832-40, 1993.

EKOR, M. et al. *Hibiscus sabdariffa* ethanolic extract protects against dyslipidemia and oxidative stress induced by chronic cholesterol administration in rabbits. **African Journal of Medicine & Medical Sciences**. v. 39, Suppl, p. 161-70, 2010.

EMILE, A. et al. Bioassay-guided isolation of antifungal alkaloids from *Melochia odorata*. **Phytotherapy Research**. v. 4, 2007.

ERAS-ERDOGAN, N. et al. Relationship between polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and breast cancer. **Mutation Research**, v. 680, n. 1-2, p. 7-11, 2009.

FALCÃO-SILVA, V. S. et al. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Research**. v. 23, n. 10, p. 1367-70, 2009.

FOLLI, F. et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. **Current Diabetes Reviews**. v. 7, n. 5, p. 13-24, 2011.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. v. 33, n. 7, p. 829-37, 2012.

FRIEDMAN, J.S. et al. SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness. **Blood**. v. 104, n. 8, p. 2565-73, 2004.

FRYXELL, P.A. The American genera of Malvaceae II. **Brittonia**. v. 49, n. 2, p. 204-269, 1997.

FUKUTO, J.M.; HOBBS, A.J.; IGNARRO, L.J. Conversion of nitroxyl (HNO) to nitric oxide (NO) in biological systems: the role of physiological oxidants and relevance to the biological activity of HNO. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 196, n. 2, p. 707-713, 1993.

GARCIA, C.M. Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Pavonia distinguenda* A.St.-Hill. & Naudin e *Dorstenia brasiliensis* Lam. Santa Maria, RS: UFSM, 186p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

GEHRKE IT. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **J Ethnopharmacol.** v. 148, n. 2, p. 486-91, 2013.

GILMAN, G.A. The pharmacological basis of therapeutics. In: BENET L.Z.; KROETZ D.L.; SHEINER L.B. **Pharmacokinetics**: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. 9th ed. The Mc-Graw-Hill Companies. 1996. p. 12-16.

GOTTLIEB, M.G. et al. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein e polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genetics and Molecular Research.** v. 4, n. 4, p. 691-703, 2005.

GRAHAM, J. G. et al. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 73, n. 3, p. 347-377, 2000.

GRINGS, M. Two new species of *Pavonia* section *Lebretonia* subsection *Hastifoliae* (Malvaceae-Malvoideae) from southern Brazil. **Phytotaxa.** v. 39, p. 38-46, 2012.

GRINGS, M.; KRAPOVICKAS, A.; BOLDRINI, I. I. A new species of *Pavonia* (Malvaceae) from southern Brazil. **Systematic Botany.** v. 36, n. 2, p. 419-423, 2011.

GRINGS, M.; BOLDRINI, I. I. O genero *Pavonia* Cav. (Malvaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência,** v. 11, n. 3, p.352-380, 2013.

GUL, M.Z. et al. Evaluation of *Abelmoschus moschatus* extracts for antioxidant, free radical scavenging, antimicrobial and antiproliferative activities using in vitro assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** v. 17, n. 11, p. 64, 2011.

GURROLA-DÍAZ, C.M. et al. Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). **Phytomedicine.** v.17, n. 7, p. 500-5, 2010.

HALL, D.T.; MA, J.F.; MARCO, S.D.; GALLOUZI, I.E. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. **Aging.** v. 3, n. 8, p. 702-15, 2011.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews,** v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.



HIRST, D.; ROBSON, T. Nitric oxide in cancer therapeutics: interaction with cytotoxic chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 4, p. 411-20, 2010.

HOLLEY, A.K. et al.; DHAR, S.K.; Xu, Y.; ST. CLAIR, D.K. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p. 139-58, 2012.

HOU, D.X. et al. Delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus anthocyanin*, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 1, n. 440 (1), p. 101-9, 2005.

HUANG, P. et al. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. **Nature**. v. 407, n. 21, p. 390-5, 2000.

IBGE. 2004. Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

IGNARRO, L. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p. 9265-69, 1987.

IGUCHI, T. et al. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. **In Vivo**. v. 23, n. 1, p. 7-12, 2009.

INTAPAD, S. et al. Long-term effect of phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb. on vascular relaxation in ovariectomized rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, n. 3, p. 758-64, 2012.

IPPOUSHI, K. et al. [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. **Life Sciences**. v. 73, n. 26, p. 3427-37, 2003.

ISLER, M. et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. **Croatian Medical Journal**. v. 43, n. 1, p. 16-9, 2002.

IUCHI, Y. et al. Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production. **Biochemistry Journal**. v. 402, n. 2, p. 219-27, 2007.

JI, C. et al. *Gossypium herbaceum* L. extracts ameliorate disequilibrium of IL-1RA/IL-1 $\beta$  ratio to attenuate inflammatory process induced by amyloid  $\beta$  in rats. **Current Alzheimer Research**. v. 8, p. 953-61, 2012.

JUNG, J.; NA, C.; HUH, Y. Alterations in nitric oxide synthase in the aged CNS. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2012, p. 718976, 2012.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9ª Edição, Editora: Guanabara, 2006. 991 p.

KIM, S.Y. et al. The plant phenolic diterpene carnosol suppresses sodium nitroprusside-induced toxicity in c6 glial cells. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 3, p. 1543-50, 2010.

KINGSTON, D. G. I. Anticancer agents from natural products. **Journal of Natural Products**. v. 74, n. 5, p. 1352, 2005.

KININGHAM, K.K.; St. CLAIR, D.K. Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase Selectively Modulates the Activity of Jun-associated Transcription Factors in Fibrosarcoma Cells1. **Cancer Research**. v. 57, n. 1, p. 5265-71, 1997.

KNOTT, A.B.; BOSSY-WETZEL, E. Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 12, Suppl 2, p.126-33, 2010.

KONATÉ, K. et al. Antibacterial activity against  $\beta$ - lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 11, n. 11, p. 18 , 2012a.

KONATÉ, K. et al. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba L.* (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 11, p. 5, 2012b.

KONATÉ, K. et al. In vitro antioxidant, lipoxygenase and xanthine oxidase inhibitory activities of fractions from *Cienfuegosia digitata Cav.*, *Sida alba L.* and *Sida acuta* Burn f. (Malvaceae). **Pakistan Journal of Biological Sciences**.v. 15, n. 13(22), p. 1092-8, 2010.

KONATÉ, K. et al. Toxicity assessment and analgesic activity investigation of aqueous acetone extracts of *Sida acuta* and *Sida cordifolia L.* (Malvaceae), medicinal plants of Burkina Faso. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 12, p.120, 2012c.

KONATÉ, K.; ZERBO, P.; OUÉDRAOGO, M. Anti-nociceptive properties in rodents and the possibility of using Polyphenol-rich fractions from *Sida urens L.* (Malvaceae) against of dental caries Bacteria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 21, n. 12(1), p. 14, 2013.

KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **FEBS Letters**. v. 413, n. 2, p. 236-238, 1997.

KUBAVAT, J.B.; ASDAQ, S.M. Role of *Sida cordifolia L.* leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, n. 1, p. 162-5, 2009.

KULIG K. Cyanide antidotes and fire toxicology. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 25, p.1801-2, 1991.

KUMAR, V. et al. Antidyslipidemic and Antioxidant Activities of *Hibiscus rosa sinensis* Root Extract in Alloxan Induced Diabetic Rats. **Indian Journal of Clinical and Biochemistry**. v. 28, n. 1, p. 46-50, 2013.

KUMAR, V. et al. Hypolipidemic activity of *Hibiscus rosa sinensis* root in rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. v. 46, n. 6, p. 507-10, 2009.

KUO, P. C. et al. Chemical constituents from *Abutilon indicum*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 10, n. 7-8, p. 699-703, 2008.

KUO, S. C. et al. Decrease of hyperglycemia by syringaldehyde in diabetic rats. **Hormone and Metabolic Research**. v. 46, n. 1, p. 8-13, 2014.

LAM, S.K.; NG, T.B. Novel galactonic acid-binding hexameric lectin from *Hibiscus mutabilis* seeds with antiproliferative and potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities. **Acta Biochimica Polonica**. v. 56, n. 4, p. 649-54, 2009.

LANCASTER, J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**. v. 1, p. 18–30, 1997.

LEE, H.J. et al. Protection of prenylated flavonoids from Mori Cortex Radicis (Moraceae) against nitric oxide-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Archives of Pharmacal Research**. v. 35, n. 1, p. 163-70, 2012.

LEE, W. C, et al. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n. 6, p. 2206-10, 2009.

LI, M.Y. et al. 3-O-methylthespesilactam, a new small-molecule anticancer pan-JAK inhibitor against A2058 human melanoma cells. **Biochemical Pharmacologic**. v. 15, n. 86(10), p. 1411-8, 2013.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**. v.11, p. 376–81, 1995.

LIEWEI, W. FKBP51 regulation of AKT/Protein Kinase B Phosphorylation. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 11, n. 4, p. 360–364, 2011.

LIN, H.H. et al. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa L.* on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. **Chemico-Biological Interactions**. v. 5, n. 165(1), p. 59-75, 2007.

LISSY, K.P.; SIMON, T.K.; LATHAB, M.S. Antioxidant potential of *Sida retusa*, *urenalobata* and *Triumfetta rhomboidea*. **Ancient Science of life**. v. 25, n. 3-4, p. 10-5, 2006.

LIU, Y. et al. Effects of *Gossypium herbaceam* extract administration on the learning and memory function in the naturally aged rats: neuronal niche improvement. **Journal Alzheimer's Disease**. v. 1, p. 101-11, 2012.

MANICA-CATTANI, M.F. et al. Effect of the interleukin-1B gene on serum oxidized low-density lipoprotein levels. **Clinical Biochemistry**. v.45, n.9, p. 641-5, 2012.

MAO, C. et al. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 136, n. 7, p. 975-9, 2010.

MAROUANE. W. et al. The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. **Lipids Health Disiese**. v. 23, p. 10:65, 2011.

MARTIN, F. M.; BYDLON, G. FRIEDMAN, J.S.SOD2-deficiency sideroblastic anemia and red blood cell oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 7-8, p. 1217-25, 2006.

MARTIN, F.M. et al. SOD2 deficient erythroid cells up-regulate transferrin receptor and down-regulate mitochondrial biogenesis and metabolism. **PLOS One**. v. 6, n. 2, p. e16894, 2011.

MAZUMDER, U.K. et al. Antibacterial activity of *Urena lobata root*. **Fitoterapia**.v. 72, n. 8, p. 927-9, 2001.

MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 6049-55, 1969.

MEIRELES, M. A. A. **Extracting bioactive compounds for foods product: theory and applications.** CRC press, 2009.

MERRY, T. L.; MCCONELL, G. K. Do reactive oxygen species regulate skeletal muscle glucose uptake during contraction? **Exercise and Sport Sciences Reviews.** v. 40, n. 2, p. 102–105, 2012.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina, Ribeirão Preto.** v.39, n. 4, p. 515-21, 2006.

MIAO, L.; ST CLAIR, D.K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. **Free Radical Biology and Medicin.** v. 47, n. 4, p. 344-56, 2009.

MILLER, M.R.; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology.** v. 151, n. 3, p. 305-21, 2007.

MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine.** v. 120, n. 2, p.187-91, 1992.

MONCADA, S. The "Sanchez-Medal" Lecture Award: nitric oxide 1994. **Revista de Investigación Clínica.** p.15-7, 1994.

MONTAGNER, G.F. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro.** v. 24, p. 1410-16, 2010.

MONTANO, M.A. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and cellular biochemistry,** v.328, n. 1-2, p. 33-40, 2009.

MONTANO, M.A.E. et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine.** v. 60, n. 1, p. 30-3, 2012.

MOUJIR, L. et al. Cytotoxic activity of lignans from *Hibiscus cannabinus*. **Fitoterapia.** v. 78, n. 5, p. 385-7, 2007.

MOSTARDEIRO, M.A. et al. Cyclopeptide alkaloids: stereochemistry and synthesis of the precursors of discarines C and D and myrianthine A. **J Nat Prod.** v. 76, n. 7, p. 1343-50, 2013.

MOZAFFARI-KHOSRAVI, H. et al. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 15, n. 8, p. 899-903, 2009.

MUÑOZ, M. et al. SNP-mediated neuroprotection under glucose deprivation is enhanced by *Hypericum perforatum*. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**. v. 11, n. 2, p.162-73, 2012.

NARENDHIRAKANNAN, R. T.; LIMMY, T. P. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Sida rhombifolia* stems and roots in adjuvant induced arthritic rats. **Immunopharmacology Immunotoxicology**. v. 34, n. 2, p. 326-36,2012.

NATHAN,C.F.; HIBBS, J.B. JR. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current opinion in immunology**. v. 3, n. 1, p. 65-70, 1991.

OBERLEY, L.W.; OBERLEY, T.D. The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis. **Journal of Theoretical Biology**. v. 106, n. 3, p. 403–22, 1984.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**. v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, p. 524-6, 1987.

PARK, J. W. et al. A leaf methanolic extract of *Wercklea insignis* attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking the NF- $\kappa$ B signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. **Inflammation**.v. 1, p. 321-31, 2012.

PENG, CH. et al. *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 28, n. 59(18), p. 9901-9, 2011.

PERERA, R.M.; BARDEESY, N. Cancer: when antioxidants are bad. **Nature**. v. 475, n. 7354, p. 43–4, 2011.

PEREZ GUTIERREZ, R. M. Evaluation of hypoglycemic activity of the leaves of *Malva parviflora* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food & Function**. v. 3, n. 4, p. 420-27, 2012.

PESSÔA, R. F.; NÁCUL, F. E.; NOËL, F. Farmacogenética e farmacogenômica. Evidências de como a genética pode influenciar a eficácia de fármacos e a busca por novos alvos farmacológicos. **Infarma**. v.18, n. 11/12, p. 41-8, 2006.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**. v.67, n.5, p.289-297, 1997.

PORCHEZHIAN, E.; ANSARI, S. H. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. **Phytomedicine**. v. 12, n. 1-2, p. 62-4, 2005.

PUBMED, Família Malvaceae, acesso em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=malvaceae>, janeiro de 2014.

PUEL, C. et al. Preventive effect of *Abelmoschus manihot* (L.)Medik.on bone loss in the ovariectomised rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 13, n. 99(1), p. 55-60, 2005.

RAHUMAN, A. et al. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. **Parasitology Research**. v.102, n. 5, p. 981-8, 2008.

RAMBO, B.R. Malvaceae Riograndenses. **Pesquisas**. v. 24, p. 50, 1967.

RANG, H.P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829p.

RAO, B.G.; RAO, Y.V.; RAO, T.M. Hepatoprotective and antioxidant capacity of *Melochia corchorifolia* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 6, n. 7, p. 537-43, 2013.

REDDY, Y.S.; VENKATESH, S.; SURESH, B. Antinociceptive activity of *Malvastrum coromandelinum*. **Fitoterapia**. v. 72, n. 3, p. 278-80, 2001.

REJITHA, S.; PRATHIBHA, P.; INDIRA. M. Amelioration of alcohol-induced hepatotoxicity by the administration of ethanolic extract of *Sida cordifolia* Linn. **British Journal of Nutrition**. v. 108, n. 7, p. 1256-63, 2012.

RENDA, G. et al. Genetic determinants of blood pressure responses to caffeine drinking. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 95, n. 1, p. 241-8, 2012.

ROBIN, E.D.; McCAULEY, R. Nitroprusside-related cyanide poisoning. Time (long past due) for urgent, effective interventions. **Chest**. v. 102, n. 6, p. 1842-5, 1992.

ROESCH, L.F.W. et al. The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. **Diversity**. v. 1, p. 182-98, 2009.

RUSSO, P.; DEL BUFALO, A.; CESARIO, A. Flavonoids Acting on DNA Topoisomerases: Recent Advances and Future Perspectives in Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 31, p. 5287-93, 2012.

RUSYN, I.; GATTI, D.M.; WILTSHIRE, T.; KLEEBERGER, S.R.; THREADGILL, D.W. Toxicogenetics: population-based testing of drug and chemical safety in mouse models. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 8, p. 1127-1136, 2010. Doi:10.2217/pgs.10.100.

SAHA, R.N.; PAHAN, K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 8, n. 5-6, p. 929-47, 2006.

SALA, A., et al. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **Eur J Pharmacol**, v. 461, p. 53-61, 2003.

SAMUEL, A. J. et al. *Hibiscus vitifolius* (Linn.) root extracts shows potent protective action against anti-tubercular drug induced hepatotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 141, n. 1, p. 396-402, 2012.

SANDHU, I.S.; WARE, K.; GRISHAM, M.B. Peroxyl radical-mediated hemolysis: Role of lipid, protein and sulfhydryl oxidation. **Free Radical Research**. v. 16, n.2, p. 111-122, 1992.

SANTOS, S.S. et al. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. **Shock**. v. 38, n. 1, p. 18-23, 2012.

SEETHARAM, Y.N. et al. Hypoglycemic activity of *Abutilon indicum* leaf extracts in rats. **Fitoterapia**. v. 73, n. 2, p. 156-9, 2002.

SHAH, A.S.; ALAGAWADI, K.R. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Thespesia populnea Soland* ex. Correa seed extracts and its fractions in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 11, n. 137(3), p. 1504-9, 2011.

SHARMA, S.; KHAN, N.; SULTANA, S. Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by *Hibiscus rosa sinensis* extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice. **European Journal of Cancer Prevention**. v. 13, n. 1, p. 53-63, 2004.

SHASTRY, B.S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **The Pharmacogenomics Journal**. v. 6, n. 1, p. 16-21, 2006.

SHUKLA, V.S. AND NIGAM, I.C. **Journal and Proceedings of the Institute of Chemistry**. v. 33, p. 229-233, 1961.



SREEDEVI, C. D. et al. Hepatoprotective studies on *Sida acuta* Burm. f. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 15, n. 124(2), p. 171-5, 2009.

STILL, PC. et al. Alkaloids from *Microcos paniculata* with cytotoxic and nicotinic receptor antagonistic activities. **Journal of Natural Products**. v. 22, n. 76(2), p. 243-9, 2013.

SUGAMORI, T. et al.. Increased nitric oxide in proportion to the severity of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy: close correlation of tumor necrosis factor-alpha with systemic and local production of nitric oxide. **Circulation Journal**. v. 66, n. 7, p. 627-32, 2002.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, v. 13, p. 145-57, 2003.

SUZUKI, E. et al. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **Journal of Affective Disorders**, v. 63, n. 1-3, p. 221-4, 2001.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **Journal of Gerontology Biological Sciences**, v. 60A, n. 4, p. 432-8, 2005.

TAUSER, R.-G. Pharmacogenetics: Matching the Right Foundation at Personalized Medicine in the Right Genomic Era. In: Sanoudou, D. (Ed.). **Clinical Applications of Pharmacogenetics**. Croácia: InTech, 2012. p. 3-34. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/clinical-applications-ofpharmacogenetics/>>. Acesso: 13 jan. 2013.

TAYLOR, A.L. Nitric oxide modulation as a therapeutic strategy in heart failure. **Heart Failure Clinics**. v. 8, n. 2, p. 255-72, 2012.

TEWTRAKUL, S. et al. Anti-inflammatory principles from *Heritiera littoralis* bark. **Phytomedicine**. v.17, n. 11, p. 851-855, 2010.

THOUNAOJAM, M. C. et al. Cardioprotective effect of *Sida rhomboidea*. *Roxb* extract against isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 36, n. 1, p. 171-84, 2008.

THOUNAOJAM, M. C. et al. *Sida rhomboidea*.*Roxb* extract alleviates pathophysiological changes in experimental in vivo and in vitro models of high fat diet/fatty acid induced non-alcoholic steatohepatitis. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 64, n. 3, p. 217-24, 2012b.

THOUNAOJAM, M. C. et al. *Sida rhomboidea*.Roxb aqueous extract down-regulates in vivo expression of vascular cell adhesion molecules in atherogenic rats and inhibits in vitro macrophage differentiation and foam cell formation. **Immunopharmacology Immunotoxicology**. v. 34, n. 5, p. 832-43, 2012a.

THOUNAOJAM, M.C. et al. In vitro evidence for the protective role of *Sida rhomboidea*. Roxb extract against LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. **Cardiovascular Toxicology**. v. 11, n. 2, p. 168-79, 2011.

TIAN, C. et al. Accuracy mass screening and identification of phenolic compounds from the five parts of *Abutilon theophrasti* Medic. by reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupoles-time of flight-mass spectrometry. **Journal of separations Science**. v. 35, n. 5-6, p. 763-72, 2012.

TREVISAN, G. et al. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. **J Nat Prod**. v. 72, n. 4, p. 608-12, 2009.

TSIMPLOULI, C. et al. In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 181-90, 2012.

TSUKAMOTO, S. S; TOMISE, K.; ABURATANI, M. et al. Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*. **J Nat Prod**, v. 67, p. 1839–1841, 2004.

VAHITHA, R. et al. Larvicidal efficacy of *Pavonia zeylanica* L. and *Acacia ferruginea* D.C. against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource Technology**. v. 82, n. 2, p. 203-4, 2002.

VASUDEVAN, M.; PARLE, M. Pharmacological actions of *Thespesia populnea* relevant to Alzheimer's disease. **Phytomedicine**. v. 13, n. 9-10, p. 677-87, 2006.

VILLALPANDO-ARTEAGA, E.V. et al. *Hibiscus sabdariffa*L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c in diet-induced obese mice. **Food & Function**. v. 25, n. 4(4), p. 618-26, 2013.

VISWANATHA, G. L. et al. Antidiarrheal effect of fractions from stem bark of *Thespesia populnea* in rodents: Possible antimotility and antisecretory mechanisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 4, n. 6, p. 451-6, 2011.

WHEELER, M.A. et al. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 1, p. 110-6, 1997.

WHELAN L. C., RYAN M. F. Ethanolic extracts of *Euphorbia* and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumour cell growth. **Phytomedicine**. v. 10, p. 53–58, 2003.

WILLARD, F.H. Organization, Variation and Expression of the Human Genome as a Foundation of Genomic and Personalized Medicine. In: Willard, H.F. & Ginsburg, G.S. (Ed). **Genomic and Personalized Medicine**. London:Academic Press. 2009. p. 4-21.

WILLIAMS, R.J.P. Nitric oxide in biology: its role as a ligand. **Chemical Society Reviews**. v. 25, n. 2, p. 77–83, 1996.

WINLAW, D.S. et al. Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet*. v. 344, n. 8919, p. 373-4, 1994.

WOODCOCK, J.; LESKO, L.J. Pharmacogenetics -Tailoring Treatment for the Outliers. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 8, p. 811-813, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International drug monitoring: the role of national centers. Geneva, 1972 (WHO technical Report Series, 498). Disponível em:<<http://www.who-umc.org/graphics/24756.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

YAMAMOTO, Y. et al. Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin E. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v. 32, n. 5, p. 475-79, 1986.

YANG, MY.et al. The hypolipidemic effect of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 27, n. 58(2), p. 850-9, 2010.

YASMIN, S.et al. Antioxidant potential and radical scavenging effects of various extracts from *Abutilon indicum* and *Abutilon muticum*. **Pharmaceutical Biology**. v. 48, n. 3, p. 282-9, 2010.

YOUNS, M.; HOHEISEL, J.D.; EFFERTH, T. Toxicogenomics for the prediction of toxicity related to herbs from traditional Chinese medicine. **Planta Medica**, v. 76, n. 17, p. 2019-25, 2010.

ZAHID, H. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of *Hibiscus schizopetalus* (Mast) Hook in alloxan-induced diabetic rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 27, n. 1, p. 83-9, 2014.

ZARTH, P. A.; GERHARDT, M. Uma história ambiental do pampa do Rio Grande do Sul. In: TEIXEIRA FILHO, A. (Org.) **Lavouras de Destruição: a (im)posição do consenso**. Pelotas: [s.n.], 2009, p. 250-295.

ZEJNILOVIC, J. et al. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 189, n.1, p. 1-4, 2009.

ZHANG, W.; DOLAN, M. E. Use of cell lines in the investigation of pharmacogenetic loci. **Current Pharmaceutical Design**. v.: 5, n. 32, p. 3782-95, 2009.

ZHAO, J. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton crassifolius* ethanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 142, n. 2, p. 367-73, 2012.

ZONGO, F. et al. Bioguidage search of active compounds from *Waltheria indica* L. (Malvaceae) used for asthma and inflammation treatment in Burkina Faso. **Fundamental Clinical Pharmacology**. 2013. Doi: 10.1111/fc