

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

Thainara de Andrade Fortes

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E DA TOXICIDADE *in vivo* DE *Leandra australis***

Santa Maria, RS
2021

Thainara de Andrade Fortes

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E DA TOXICIDADE *in vivo* DE *Leandra australis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Liliane de Freitas Bauermann
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Amanda Leitão Gindri

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Fortes, Thainara
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E DA TOXICIDADE in vivo DE *Leandra*
australis / Thainara Fortes.- 2021.
51 p.; 30 cm

Orientadora: Liliane de Freitas Bauermann
Coorientadora: Amanda Leitão Gindri
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

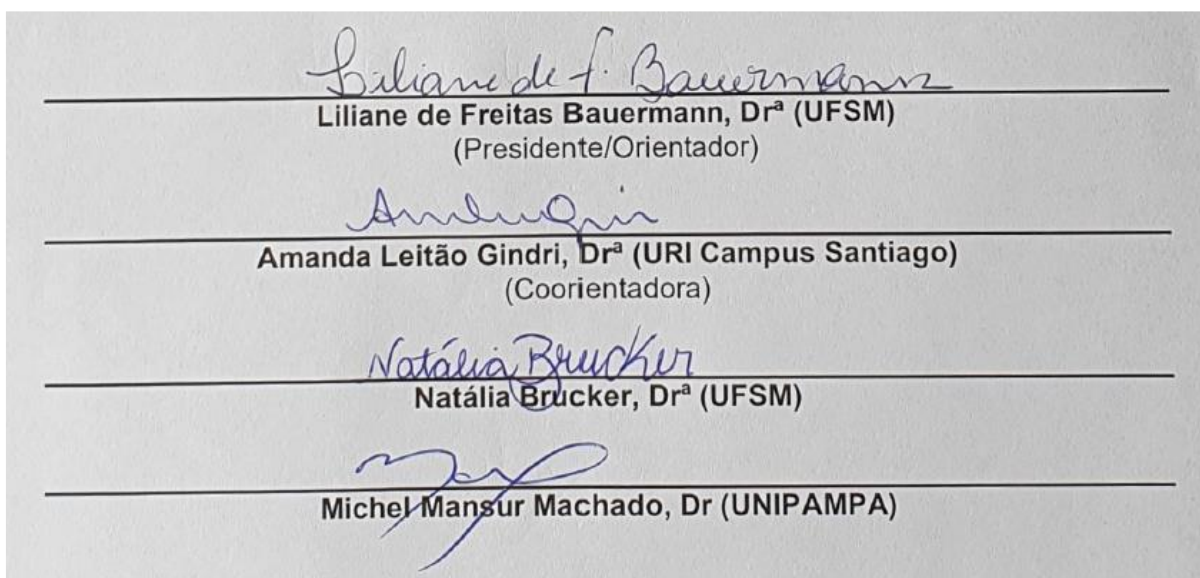
1. Toxicidade I. de Freitas Bauermann, Liliane II.
Leitão Gindri, Amanda III. Título.

Thainara de Andrade Fortes

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E DA TOXICIDADE *in vivo* DE *Leandra australis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 23 de agosto de 2021:



Liliane de Freitas Bauermann
Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Amanda Leitão Gindri
Amanda Leitão Gindri, Dr^a (URI Campus Santiago)
(Coorientadora)

Natália Brucker
Natália Brucker, Dr^a (UFSM)

Michel Mansur Machado
Michel Mansur Machado, Dr (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

A família e aos amigos que me apoiaram e acreditaram em mim. A conquista é de todos nós!

AGRADECIMENTOS

A Jesus pela sua fidelidade, graça e favor em minha vida! Não há absolutamente nada de bom em mim. Toda e qualquer bondade que possa existir em mim, testemunha a Sua existência e grandiosidade. Obrigada por me mostrar o caminho de volta à casa do Pai e por me dar a clareza dos Teus propósitos. Eu te amo por tudo o que Tu és e por tudo o que eu sou quando estou em Tua presença.

Aos meus pais por todo esforço que fazem para que eu possa realizar os meus sonhos, por todo amor, cuidado e proteção. Não tenho palavras para expressar a importância de vocês na minha vida. Meu amor por vocês vai além da vida!

A Prof Liliane pela paciência, por ter me aceitado em seu laboratório e por ter me dado a oportunidade da realização deste sonho. Você é um ser humano incrível! Muito obrigada pelo carinho e atenção dedicados a mim. Levo você no coração!

A Prof Amanda por acreditar em mim, por me mostrar o caminho certo e percorrer esse caminho ao meu lado. Obrigada por me aconselhar nos momentos difíceis e mostrar a importância da disciplina, do foco e da perseverança. Você mora no meu coração e é inspiração para mim!

A equipe do LaFEx por terem me recebido e me ajudado a desempenhar este trabalho. Em especial agradeço a Camille, Gabi e a Rafa que me permitiram ajudar em seus experimentos, e assim, contribuíram para o meu aprendizado. A Camille também agradeço por ter me recebido e me auxiliado nos primeiros meses como pós-graduanda. A Kássia, Patrícia, Amanda e Juliana que me auxiliaram em vários momentos de dúvida e nos experimentos. Nada conseguimos fazer sozinhos, então, muito obrigada por tudo e por todo o suporte!

Ao Jaime Aramburu, médico veterinário do Departamento de Farmacologia, agradeço por ter me ajudado e me ensinado durante os meses de experimento.

A equipe do Labplam (URI Santiago), em especial a Leriana e a Roselaine que me auxiliaram nas extrações da planta enquanto eu estava em Santa Maria. Agradeço também a Pâmila e Jéssica que foram muito importantes na realização de diversas análises presentes nesta pesquisa. E a Patrícia, minha amiga do coração, pela ajuda nos experimentos e por ser essa pessoa incrível que nunca mediu esforços para me ajudar. Muito obrigada pela amizade e por toda força que me deram. Vocês são mais do que especiais!

A Adriane Bianchini, agradeço pela amizade, pelos conselhos e por dispor de seu tempo para me ajudar em todas as vezes que precisei. Gratidão por tudo!

A minha amiga/irmã Isadora Rosa, agradeço pela ajuda, pela amizade e pela força. Tê-la em minha vida é um presente imensurável! Obrigada por nunca me deixar sozinha!

A amiga Márcia Andres, que eu carinhosamente chamo de “mãe emprestada”. Não posso deixar de agradecer por ser uma das pessoas que mais acredita em mim. Obrigada por dispor do seu tempo para me ouvir, aconselhar e encorajar. Obrigada por me ensinar a ver de uma perspectiva diferente e assim perceber que tudo é possível. Você é luz!

As primas Laura e Regina, por terem me recebido em Santa Maria e me auxiliado em tantos momentos. Obrigada Regina, por ter sido minha mãe nos momentos em que a minha não pôde estar comigo e a Laura por ser essa prima tão especial que nunca mediu esforços para me ajudar (até sendo minha IC nos momentos vagos). E claro, um agradecimento especial ao Toby (in memoriam) que coloriu os nossos dias em SM. Serei eternamente grata!

A Gabriela Wesz, minha amiga/irmã há mais de 10 anos, acompanhou cada sonho e conseqüentemente a conquista deles. Obrigada por mesmo de longe ter sido tão presente na minha vida. Teu apoio e tua amizade serviram de suporte, pode ter certeza!

A UFSM e ao PPGCF agradeço pela oportunidade de aprender e de evoluir num cenário diferente de tudo o que eu já havia vivido. A vivência na universidade me permitiu crescer como profissional e como pessoa. Sou grata por isso!

A CAPES pelo recurso financeiro empregado e que tornou possível a realização desta pesquisa.

Deixo um agradecimento especial a URI Campus Santiago que me deu a oportunidade da realização de diversas análises presentes neste trabalho. Obrigada por todas as oportunidades de aprendizado e pela confiança de sempre!

“Nossos maiores sonhos sem Ele são pequenos demais. Nossas melhores qualidades, insuficientes. Por isso, não poderíamos, ainda que quiséssemos, descobrir quem somos verdadeiramente, encontrar qual é o nosso propósito e cumpri-lo sem Deus”.

(Deive Leonardo)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA TOXICIDADE *in vivo* DE *Leandra australis*

AUTORA: Thainara de Andrade Fortes
ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann
COORIENTADORA: Amanda Leitão Gindri

A riqueza da biodiversidade brasileira e a tradição popular sobre plantas ditas como medicinais faz com que a fitoterapia seja amplamente utilizada nos dias atuais. Dentre as plantas utilizadas, destaca-se a espécie *Leandra australis*, conhecida popularmente como pixirica. Esta espécie é utilizada popularmente para doenças inflamatórias e como emagrecedora. Apesar de seus usos populares, há poucos estudos na literatura atual sobre suas moléculas químicas e atividades farmacológicas. Além disso, até o momento, não foram encontrados estudos toxicológicos com esta espécie vegetal. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química, toxicidade e atividade antioxidante de *L. australis*. A planta foi coletada em Março/2015, identificada e extraída por maceração, com etanol 50%. Posteriormente, seu extrato bruto foi fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol). O extrato bruto, frações e resíduo aquoso restante do fracionamento foram concentrados em evaporador rotatório sob temperatura inferior a 45°C. A avaliação da composição química por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) acoplado à Espectrometria de Massas foi realizada com o extrato bruto. As quantificações de metabólitos secundários (polifenóis totais, flavonoides, taninos condensados e alcaloides totais) foram realizadas em Espectrofotometria UV-Vis com o extrato bruto, frações e resíduo aquoso. A avaliação da atividade antioxidante do extrato, frações e resíduo aquoso ocorreu por três métodos diferentes realizados também em Espectrofotômetro UV-Vis, sendo eles: avaliação da captura do radical DPPH, determinação da habilidade de redução do ferro (FRAP), e co-oxidação com betacaroteno e ácido linolênico. A avaliação da toxicidade do extrato bruto foi realizada a partir de métodos alternativos *in vivo*, sendo a citotoxicidade realizada em *Artemia salina* e a genotoxicidade realizada em células de radículas de *Allium cepa*. A toxicidade também foi avaliada a partir de protocolos de toxicidade aguda e de doses repetidas de 28 dias da OECD 423 e 407 utilizando ratos *Wistar*. As amostras com maior rendimento foram resíduo aquoso, butanol e extrato bruto. Nos doseamentos destacaram-se o elevado teor de compostos fenólicos e taninos condensados nas amostras, sendo também possível quantificar o ácido gálico (19,32±0,39 mg/g de extrato), rutina (12,30±0,01 mg/g de extrato) e quercetina (162,58±0,68 mg/g de extrato) no extrato da planta analisado em CLAE. A espécie em estudo apresentou considerável atividade antioxidante em seu extrato e frações. O perfil de toxicidade da espécie, inédito, não apresentou citotoxicidade para *A. salina* (CL₅₀ 1.607,15 µg/mL), porém foi evidenciada uma possível atividade antiproliferativa (genotóxica) no extrato bruto desta espécie. A avaliação da toxicidade em ratos *Wistar* mostrou que a administração aguda e de doses repetidas não ocasionou mortes ou alterações comportamentais nos animais. Porém, a administração aguda identificou alterações nos níveis de BUN nos animais testados, o que mostra possível dano renal. Quando administrada de forma contínua por 28 dias, a planta não ocasionou alterações hematológicas e a avaliação bioquímica não identificou sinais de toxicidade. Estes resultados mostram que a espécie vegetal apresenta baixa toxicidade e reforça a importância da realização de estudos sobre administração oral crônica a fim de confirmar a segurança para seu uso medicinal.

Palavras-chave: Melastomataceae. Toxicidade. HPLC-DAD-MS. Pixirica.

ABSTRACT

EVALUATION OF PHYTOCHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND *in vivo* TOXICITY OF *Leandra australis*

AUTHOR: Thainara de Andrade Fortes
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann
CO-ADVISOR: Amanda Leitão Gindri

The richness of Brazilian biodiversity and the popular tradition of plants known as medicinal make phytotherapy widely used today. Among the plants used, the species *Leandra australis*, popularly known as pixirica, stands out. This species is popularly used for inflammatory diseases and as a weight-loss. Despite its popular uses, there are few studies in the current literature on its chemical molecules and pharmacological activities. Furthermore, so far, no toxicological studies have been found with this plant species. Therefore, this work aimed to evaluate the chemical composition, toxicity and antioxidant activity of *L. australis*. The plant was collected in March/2015, identified and extracted by maceration, with ethanol 50%. Subsequently, its crude extract was fractionated with increasing polarity solvents (hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol). The crude extract, fractions and remaining aqueous residue of the fractionation were concentrated in a rotary evaporator at a temperature below 45°C. The evaluation of the chemical composition by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) coupled to Mass Spectrometry was performed with the crude extract. Quantifications of secondary metabolites (total polyphenols, flavonoids, condensed tannins and total alkaloids) were performed in Spectrophotometry UV-Vis with the crude extract, fractions and aqueous residue. The evaluation of the antioxidant activity of the extract, fractions and aqueous residue was carried out by three different methods also carried out in Spectrophotometer UV-Vis, namely: evaluation of DPPH radical capture, determination of iron reduction ability (FRAP), and co-oxidation with beta-carotene and linolenic acid. The evaluation of the toxicity of the crude extract was carried out using alternative methods *in vivo*, being the cytotoxicity carried out on *Artemia salina* and the genotoxicity carried out on *Allium cepa* radicle cells. Toxicity was also assessed from the OECD 423 and 407 acute toxicity and repeated dose 28-day protocols using *Wistar* rats. The samples with the highest yield were aqueous residue, butanol and crude extract. In the assays, the high content of phenolic compounds and condensed tannins in the samples stood out, being also possible to quantify the gallic acid (19.32 ± 0.39 mg/g of extract), rutin (12.30 ± 0.01 mg/g of extract) and quercetin (162.58 ± 0.68 mg/g of extract) in the plant extract analyzed in HPLC. The species under study showed considerable antioxidant activity in its extract and fractions. The toxicity profile of the species, unprecedented, did not show cytotoxicity to *A. salina* (LC_{50} 1607.15 μ g/mL), but a possible antiproliferative (genotoxic) activity in the crude extract of this species was evidenced. The evaluation of toxicity in *Wistar* rats showed that the acute administration and repeated doses did not cause deaths or behavioral changes in the animals. However, acute administration identified changes in BUN levels in the animals tested, which shows possible kidney damage. When administered continuously for 28 days, the plant did not cause hematological changes and the biochemical evaluation did not identify signs of toxicity. These results show that the plant species has low toxicity and reinforces the importance of conducting studies on chronic oral administration in order to confirm its safety for medicinal use.

Keywords: Melastomataceae. Toxicity. HPLC-DAD-MS. Pixirica.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1. Secondary metabolites of <i>Leandra australis</i>	34
Table 2. Antioxidant activity of <i>Leandra australis</i>	34
Table 3. Parameters altered after acute administration of CE <i>L. australis</i> 2000 mg/kg in rats.....	34
Table 4. Effects of administration of CE <i>L. australis</i> for 28 days on hematological parameters in rats.....	35
Table 5. Effects of administration of CE <i>L. australis</i> for 28 days on biochemical parameters.....	35

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALB	Albumina, do inglês <i>albumin</i>
ALT	Alanina aminotranferase, do inglês <i>alanine aminotransferase</i>
AN	Anormalidades, do inglês <i>abnormalities</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
AR	Resíduo aquoso de <i>Leandra australis</i> , do inglês <i>aqueous residue</i>
AST	Aspartato aminotranferase, do inglês <i>aspartate aminotransferase</i>
BC	Bastonetes, do inglês <i>band cell</i>
BUN	Ureia, do inglês <i>blood urea nitrogen levels</i>
BuOH	Fração butanol de <i>Leandra australis</i>
CE	Extrato bruto de <i>Leandra australis</i> , do inglês <i>crude extract</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCl3	Fração Clorofórmio de <i>Leandra australis</i> , do inglês <i>chloform</i>
Chol	Colesterol
CL₅₀	Concentração letal média
CRE	Creatinina
CTT	2,3,4-triphenyltetrazolic acid
DL₅₀	Dose letal média
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EtOAc	Fração acetato de etila de <i>Leandra australis</i> , do inglês <i>ethyl acetate</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
Fe³⁺	Ferro III
FRAP	Poder antioxidante pela redução do ferro, do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GGT	Gama Glutamil Transferase, do inglês <i>Gamma Glutamyl Transferase</i>
GLU	Níveis de glicose no sangue, do inglês <i>blood sugar levels</i>
HGB	Hemoglobina, do inglês <i>hemoglobin</i>
HCT	Hematócrito, do inglês <i>hematocrit</i>
HeOH	Fração hexano de <i>Leandra australis</i> , do inglês <i>hexane</i>
HPLC-DAD-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography coupled with a Mass Spectrometry Detector</i>
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>mean corpuscular hemoglobina concentration</i>
MCV	Volume corpuscular médio, do inglês <i>mean corpuscular volume</i>
MI	Índice Mitótico, do inglês <i>mitotic index</i>
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento, do inglês <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PLT	Plaquetas, do inglês <i>platelet</i>
RBC	Eritrócitos, do inglês <i>total red cell count</i>
RNA	Ácido ribonucleico
REPLAME/RS	Relação Estadual de Plantas Medicinais do Rio Grande do Sul

SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>
SLS	Lauril Sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TL	Leucócitos totais, do inglês <i>total leukocytes</i>
TPP	Proteína total, do inglês <i>total protein</i>
TRL	Triglicerídeos, do inglês <i>triglycerides</i>
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 FAMÍLIA MELASTOMATACEAE	17
2.2 GÊNERO <i>Leandra</i>	18
2.3 ESPÉCIE <i>Leandra australis</i>	19
2.3.1 Composição química de <i>Leandra australis</i>	20
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS	21
2.5 TOXICIDADE DE PLANTAS	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MANUSCRITO	29
5 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A – GRAPHICAL ABSTRACT	50
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM	51
ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	52

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia pode ser definida como o tratamento de doenças utilizando plantas. O uso dessa prática justifica-se pela riqueza da biodiversidade brasileira e também pela tradição popular envolvida (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014; MESSIAS et al., 2015). Inicialmente, as plantas foram utilizadas na sua forma natural, na preparação de chás. Posteriormente, começaram a servir como fonte para a obtenção de matéria-prima para sintetizar fármacos. Isto, devido as suas características estruturais, as quais vêm sendo estudadas como peças-chave no desenvolvimento de protótipos que servem como base para o descobrimento de novos medicamentos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014). Nos últimos anos, o Brasil tem vivido uma tendência de crescimento nos estudos envolvendo plantas utilizadas na medicina popular (ZAGO, 2018).

No entanto, diversas espécies vegetais ainda apresentam estudos insuficientes sobre suas atividades farmacológicas e sobre sua toxicidade. A relação entre a toxicidade e a segurança no uso das plantas depende de fatores como a dosagem e a frequência em que são utilizadas. Sendo assim, as plantas não podem ser utilizadas de forma indiscriminada pela população. No Brasil, apesar da evolução nas pesquisas, ainda há registros de intoxicações causadas por plantas, bem como, algumas são utilizadas com pouco conhecimento, sendo que estes muitas vezes são baseados apenas nos conhecimentos populares de gerações passadas (SANTANA et al., 2018).

Os estudos sobre a composição química e possíveis potenciais farmacológicos objetivam a comprovação da eficácia das plantas empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas (CECHINEL; YUNES, 1998). Ademais, os estudos toxicológicos objetivam a definição das plantas que podem ser utilizadas com segurança, ou daquelas com potenciais agressivos que precisam ser utilizadas com restrições (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Para tal, devemos levar em conta o metabolismo secundário, o qual é resultado da adequação da planta com o meio onde a mesma se encontra é o principal objeto de estudo devido ao potencial farmacológico que essas substâncias apresentam (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Com isso, é importante a realização da elucidação da composição química das plantas em estudo, uma vez que, as suas propriedades farmacológicas e aplicações são dependentes da mesma (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, destaca-se a espécie *Leandra australis*, pertencente à família Melastomataceae. Esta planta é nativa do estado do Rio Grande do Sul (RS), onde é conhecida popularmente como pixirica ou agulhada (BAPTISTA et al., 2013). Na medicina popular, esta espécie é utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias, colesterol, bronquite, diabetes, problemas urinários e renais, além de ser usada como emagrecedora (CEOLIN et al., 2011; PIRIZ et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).

Segundo a Portaria SES/RS 588/2017, *L. australis* está incluída na Relação Estadual de Plantas Medicinais nativas mais utilizadas pela população do RS (REPLAME/RS), além estar na lista de plantas prioritárias para estudos e pesquisas com financiamento do Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, até o momento, não foram evidenciados estudos sobre sua toxicidade. Além disso, apenas a sua composição fitoquímica preliminar foi descrita até o presente momento.

Os estudos sobre as atividades farmacológicas ainda são poucos e insuficientes para comprovar seu uso popular. Isso ressalta a importância da realização de estudos sobre sua composição química a partir de técnicas precisas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), visto que, os mesmos poderão justificar suas possíveis atividades farmacológicas. De forma complementar, os estudos sobre a toxicidade em ratos *Wistar* poderão indicar a possível segurança ou não da planta para uso popular e também poderão nortear posteriores estudos com a espécie, visando a elaboração de um fitoterápico seguro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA MELASTOMATACEAE

A família Melastomataceae apresenta aproximadamente 165 gêneros e mais de 4 mil espécies, as quais estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (RENNER, 1994). No Brasil esta família representa a sexta maior dentre as Angiospermas, sendo distribuída da Amazônia até o Rio Grande do Sul. As espécies pertencentes à família Melastomataceae são caracterizadas por uma grande diversidade de formas, uma vez que vão desde herbáceo até arbóreas (ROMERO; MARTINS, 2002). Estas espécies costumam ocupar locais distintos e diversificados. Outra importante característica são suas flores geralmente actinomorfas, perigíneas ou epigíneas (DRUMMOND; ALVES; KOSCHNITKE, 2007; LEITE, 2009).

Esta família botânica apresenta poucas espécies utilizadas tradicionalmente na medicina popular. As folhas de alguns vegetais são utilizadas para tratamento de úlceras, parasitas intestinais, reumatismo, dores de garganta, febre e infecções. Indicações como cicatrizantes e antissépticas também são citadas para estes vegetais. Algumas espécies pertencentes ao gênero *Tibouchina* são utilizadas popularmente como analgésicas. Apesar da importância desta família ainda existem poucos estudos etnomedicinais, fitoquímicos e farmacológicos sobre suas espécies (CRUZ; KAPLAN, 2004; MOREIRA, 2013).

Do ponto de vista químico, a família Melastomataceae destaca-se principalmente pela presença de ácidos graxos, triterpenoides, flavonoides e taninos. Entre os flavonoides encontrados nesta família pode-se citar: flavonas e flavonóis, flavonoides monoglicosilados e flavonoides acilglicosilados. Espécies do gênero *Miconia* evidenciaram a presença de taninos, terpenoides, flavonoides e catequinas em sua composição química (CREVELIN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; LEITE, 2009; MOREIRA, 2013).

Um estudo realizado por Leite (2009) verificou a composição química de espécies do gênero *Marcetia* em cromatografia gasosa. Este estudo identificou a presença de hidrocarbonetos como constituintes majoritários das espécies *Marcetia canescens* e *Marcetia macrophyll*. As espécies *Marcetia latifolia* e *Marcetia taxifolia* apresentaram triterpenos em sua composição química (LEITE, 2009).

Os gêneros *Trembleya*, *Melastoma*, *Miconia*, *Memecylon* e *Xyris* foram avaliados quanto a seus potenciais farmacológicos e demonstraram atividade

antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e contra alguns fungos (LEITE, 2009). Outros estudos realizados sobre as atividades farmacológicas de vegetais pertencentes a família Melastomataceae evidenciaram que a espécie *Melastoma malabathricum* apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* no ensaio de difusão em ágar (JOFFRY et al., 2012).

Esta mesma espécie foi avaliada quanto a sua capacidade antioxidante a partir do método de captura do radical DPPH (2,2- difenil-1- picrilhidrazila). Neste teste, as amostras foram testadas com concentrações entre 500 e 7,8 µg/mL. Assim, os autores evidenciaram uma elevada atividade antioxidante no extrato metanólico das flores de *M. malabathricum* com uma porcentagem de inibição de 59,3±1,4%. O extrato acetato de etila das flores de *M. malabathricum* apresentou uma porcentagem de inibição do radical de 53,2±1,3%. O extrato aquoso das folhas de *M. malabathricum* foi administrada em camundongos na concentração de 2000 mg/kg e não evidenciou efeitos tóxicos para os roedores (JOFFRY et al., 2012).

As espécies *Miconia ferruginata* e *Tibouchina granulosa* incluídas na família Melastomataceae foram avaliadas quanto ao seu perfil de toxicidade em *Artemia salina*. A espécie *M. ferruginata* teve seu extrato etanólico e frações (hexano, diclorometano, e acetato de etila) ativas contra *A. salina*. A espécie *T. granulosa* teve sua fração diclorometano com efeito tóxico para o microcrustáceo. Diferentemente, o extrato etanólico e a fração acetato de etila não apresentaram toxicidade (MOREIRA, 2013).

2.2 GÊNERO *Leandra*

O gênero *Leandra* Raddi é neotropical e composto por cerca de 200 espécies. Essas espécies estão distribuídas desde a América central até o Paraguai, nordeste da Argentina e sul do Brasil. No Brasil, o gênero *Leandra* Raddi está representado por aproximadamente 150 espécies (CAMARGO et al., 2009). Na região do estado do Paraná este gênero apresenta 75 espécies, sendo o mais rico entre os da família Melastomataceae (CAMARGO; GOLDENBERG, 2007). Caracterizando-se por apresentar inflorescências terminais ou pseudo-axilares, o gênero *Leandra* apresenta também botões florais de ápice agudo acuminado e pétalas atenuado-acuminadas a atenuado-agudas. As folhas são caracterizadas como opostas, sésseis ou pecioladas (BAUMGRATZ; SOUZA, 2005). O cálice apresenta uma variação, podendo

apresentar-se da cor verde a avermelhado. As pétalas são triangulares e sua cor pode variar de branca a rosadas. Os frutos apresentados neste gênero são carnosos, do tipo bacídio e polispérmicos (CAMARGO et al., 2009).

A diferenciação entre as espécies do gênero *Leandra* e de outras pertencentes aos gêneros *Ossaea*, *Clidemia*, *Miconia* e *Pleiochiton* geralmente é bem complexa. As espécies do gênero *Miconia* são caracterizadas por pétalas com ápice arredondado e dente externo do cálice curto. As do gênero *Clidemia* apresentam inflorescências laterais ou pseudo-laterais e pétalas com ápice arredondado. Diferentemente, *Pleiochiton* é possuidor de hábito sempre epifítico. A diferenciação entre o gênero *Osseae* é a mais complexa, sendo que é realizada com base na posição das inflorescências. Em *Osseae* as inflorescências são oxilares, e diferentemente em *Leandra* são terminais, podendo também ser pseudo-axilares. Estes fatores dificultam o reconhecimento e as delimitações entre os gêneros (GOLDENBERG; SOUZA; DEQUECH, 2005).

A dificuldade de delimitação entre os gêneros contribui para a ocorrência de problemas taxonômicos na identificação das espécies, visto que, existem vegetais indeterminados e por vezes, identificados de forma duvidosa ou errônea. Alguns estudos realizados sobre a filogenia do gênero *Leandra* evidenciaram uma origem polifilética (MARTIN et al., 2008). A divisão deste gênero ocorre em diferentes seções e dentre estas seções está *Niangae*, na qual está contida a espécie *Leandra australis* (MARTIN; MICHELANGELI, 2009).

2.3 ESPÉCIE *Leandra australis*

A espécie *Leandra australis* (Figura 1) está inclusa dentro da família Melastomataceae e é caracterizada como arbustiva ou subarbustiva. Geralmente esta espécie mede de 0,5 a 3 metros de altura e suas folhas são pecioladas, ovais e de coloração verde escura característica. O período de florescimento de *L. australis* ocorre de outubro a março, suas flores não possuem pedicelo e as pétalas são brancas (CAMARGO et al., 2009; VANA, 2010).

Figura 1 - Espécie *Leandra australis* (Cham.) Cogn.



Fonte: A autora.

Esta planta é nativa do estado do Rio Grande do Sul, onde é conhecida popularmente como pixirica ou agulhada (BAPTISTA et al., 2013). Na cultura popular, as folhas da espécie *L. australis* são utilizadas na forma de infusão para o tratamento de doenças inflamatórias, diabetes, colesterol, bronquite, problemas urinários e renais. Além do mais, esta espécie também apresenta um importante uso como emagrecedora (CEOLIN et al., 2011; PIRIZ et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).

2.3.1 Composição química de *Leandra australis*

Estudos sobre a análise fitoquímica preliminar das folhas de *L. australis* detectaram a presença de flavonoides, taninos e esteroides livres (ALICE, 1995). Um outro estudo realizado com *Leandra* sp. (pixirica), coletada entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI) avaliou a composição química das folhas do extrato aquoso (infusão) e hidroalcoólico da planta. Neste estudo, foi evidenciada a presença de taninos e saponinas no extrato aquoso (infusão). Já o extrato hidroalcoólico evidenciou positividade para taninos, saponinas, esteroides e triterpenoides. A partir destes resultados explicou-se o uso popular da planta no tratamento da bronquite, visto que, as saponinas são sabidamente responsáveis pela hidratação da secreção brônquica e os taninos pela ação sobre o edema formado na inflamação dos brônquios (CLEMES; ZENI; KRAETSCHMAR, 2008; PIRIZ et al., 2011).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS

A oxidação é um processo onde uma substância química se converte em um derivado com menor número de elétrons. Assim, ocorre a perda de um elétron para outra substância. Esse processo químico é fundamental para a sobrevivência das células. Entretanto, o mesmo ocasiona um efeito colateral que é a produção de radicais livres e de outras espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais podem causar danos oxidativos, se estiverem em excesso (ALVES et al., 2010).

A produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) são observadas em condições fisiológicas, uma vez que, essas substâncias desempenham importantes funções biológicas, como na eliminação de agentes agressores. No entanto, quando ocorre uma produção excessiva dessas substâncias, o organismo deve dispor de um sistema antioxidante que reestabeleça o equilíbrio. O excesso de substâncias oxidantes e a falta de eficiência do sistema antioxidante é denominado estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

O estresse oxidativo está envolvido em diversos mecanismos responsáveis pelo surgimento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (TORRÃO et al., 2012). Além do mais, é reconhecidamente responsável por acelerar o envelhecimento. Esse processo se dá pelo fato de que os radicais livres produzidos nas constantes reações químicas do organismo fazem com que ocorra a peroxidação dos ácidos graxos presentes na dupla camada lipídica das células, e desta forma, contribuem para o envelhecimento e morte celular, dentre outros mecanismos (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004). Cabe ressaltar também que, o estresse oxidativo está envolvido no surgimento de outras doenças, como aterosclerose, disfunção renal, artrite reumatoide, diabetes, doenças autoimunes, mutações e câncer (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; TORRÃO et al., 2012).

Diversos estudos têm descrito a importância dos antioxidantes por sua eficácia na prevenção dessas doenças que estão associadas ao estresse oxidativo (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Neste contexto, podemos destacar as plantas medicinais, as quais são importantes fontes de agentes antioxidantes, agindo através da interação com os radicais livres, evitando danos em moléculas biológicas (RATNAM et al., 2006). Alguns metabólitos secundários obtidos de plantas, como carotenoides, e polifenóis, como flavonoides e taninos estão associados a atividades

antidiabéticas, antineoplásicas, anti-inflamatórias e conseqüentemente antioxidante (ARAÚJO, 2012).

A atividade antioxidante das plantas e seus compostos ativos, despertam um grande interesse científico devido a sua possível ação benéfica sobre o colesterol-HDL. Um estudo realizado demonstrou uma eficiente atividade antioxidante da rutina, uma vez que, este composto foi capaz de atuar como ativador da superóxido dismutase. Além disso, a rutina apresentou um efeito positivo no aumento do colesterol-HDL, diminuindo assim, fatores de risco para doenças ateroscleróticas (RODRIGUES et al., 2003). Adicionalmente, a atividade antioxidante de substâncias polares pode estabelecer relação com a capacidade de inibir ou retardar o surgimento de células cancerígenas, bem como, o envelhecimento das células (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os compostos fenólicos obtidos de plantas medicinais estão diretamente relacionados a atividade antioxidante de produtos naturais. Os mesmos são conhecidos por retardarem a degradação oxidativa dos lipídios, o que evidencia também a importância do seu uso em indústrias de alimentos e cosméticos como conservantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ARAÚJO, 2012). Dentre os compostos fenólicos com atividade antioxidante destaca-se os flavonoides. No entanto, a atividade antioxidante destes compostos, por vezes, é dependente de sua estrutura molecular. Alguns destes compostos exercem sua atividade antioxidante devido a inibição de enzimas responsáveis pela produção de O_2 , como a xantina oxidase, a ciclooxigenase e lipoxigenase, o que explica também a atividade anti-inflamatória destes compostos (SIMÕES et al., 2010; YUNES; CECHINEL FILHO, 2014).

Os flavonoides também atuam capturando e neutralizando espécies oxidantes como o ânion superóxido e o radical peróxido. Neste caso, podem agir de forma sinérgica com outros antioxidantes, como as vitaminas C e E (SIMÕES et al., 2010; YUNES; CECHINEL FILHO, 2014). Diversos estudos já comprovaram uma eficiente atividade antioxidante dos compostos fenólicos *in vitro*, entretanto, ainda são necessários estudos os quais possam descrever a eficiência de sua atividade *in vivo* (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

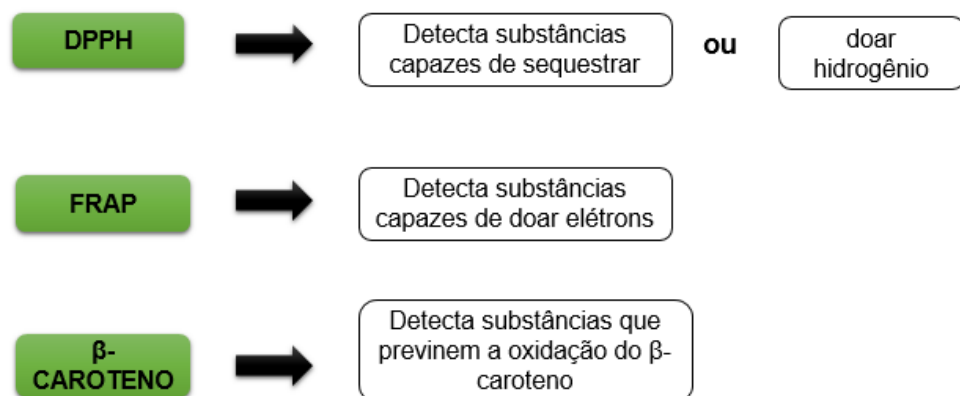
Os taninos também são reconhecidos pela sua atividade antioxidante. A atividade destes compostos está associada à sua capacidade de se ligar a proteínas suprimindo sua atividade enzimática como quelantes de metais e por sua capacidade

de agir no sequestro de radicais livres. As propriedades antioxidantes dos taninos fazem com que os mesmos estejam envolvidos em mecanismos de doenças como antitrombogênico e anti-inflamatório (ARAÚJO, 2012).

A atividade antioxidante depende não somente da reatividade química do antioxidante, mas também de outros fatores como a localização física, interação com outros componentes e condições ambientais. As metodologias *in vitro* representam importantes ferramentas que ajudam na busca por substâncias bioativas. No entanto, é importante ressaltar que dificilmente haverá uma única metodologia capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto, o que se deve a existência de diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação (ALVES et al., 2010).

Existe uma variedade de testes *in vitro*, os quais são utilizados para determinar a atividade antioxidante de extratos vegetais, dentre eles pode-se citar: ensaio de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). Estes testes representam ferramentas importantes na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, visto que, os mesmos auxiliam na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais (ALVES et al., 2010; YUNES; CECHINEL FILHO, 2014).

FIGURA 2 - Métodos para avaliação antioxidante

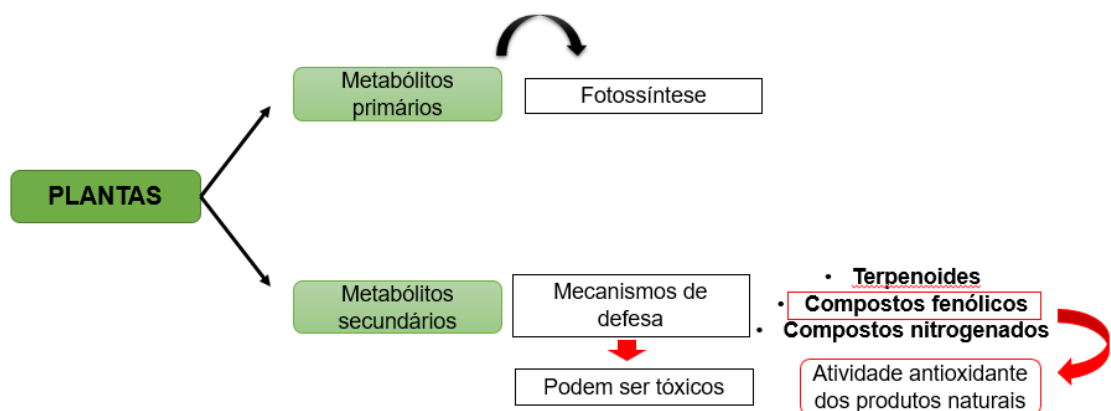


Fonte: A autora

2.5 TOXICIDADE DE PLANTAS

O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário (Figura 3). O metabolismo primário está relacionado a síntese de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Essas sínteses se dão através de vias conhecidas, como a glicólise e ciclo de Krebs. Estes processos têm como objetivo a obtenção de energia. Diferentemente, os metabólitos secundários estão relacionados a mecanismos de defesa da planta, comunicação e/ou atração polinizadores. Adicionalmente, o metabolismo secundário não está distribuído de forma igual entre as plantas, desta forma, é expressa a individualidade de famílias, gêneros e espécies botânicas (SILVA et al., 2010; PEÑA et al., 2016). O envolvimento dos metabólitos secundários com os mecanismos de defesa da planta justifica o acumulo substâncias de elevada toxicidade, as quais são capazes de desenvolver efeitos tóxicos sobre organismos vivos. (SIMÕES et al., 2010).

Figura 3 – Metabolismo primário e secundário de plantas.



Fonte: A autora

As intoxicações decorrentes de plantas podem ocorrer de várias formas que vão desde uma reação alérgica até a ingestão de plantas que acarretam em efeitos graves para organismos vivos, incluindo os seres humanos (SIMÕES et al., 2010). Diversas plantas utilizadas medicinalmente apresentam em sua composição química constituintes que, se utilizados de forma indiscriminada, desenvolvem efeitos perigosos para a saúde. Erroneamente a cultura popular acredita que pelo fato das plantas serem de origem natural podem ser utilizadas de forma indiscriminada e sem dar a devida importância aos possíveis efeitos adversos. Porém, é preciso considerar

que, alguns produtos naturais podem ter inclusive ações carcinogênicas e mutagênicas. Os estudos sobre os possíveis potenciais de toxicidade das plantas e seus constituintes ainda são pouco desenvolvidos, principalmente a nível celular (PERON et al., 2008).

Algumas plantas medicinais utilizadas na terapêutica apresentam seu perfil de toxicidade descrito na literatura. Um exemplo dessas plantas é a *Aloe arborescens* Mill, conhecida popularmente como babosa. Esta espécie vegetal tem em sua composição química antraquinonas, as quais possuem ação laxativa, e desta forma podem causar irritações e dores abdominais no intestino. As contrações da musculatura lisa uterina causadas por esta planta podem levar gestantes ao aborto. Outro exemplo dos efeitos tóxicos causados por plantas é a *Symphytum officinale* L., espécie conhecida popularmente como confrei, utilizada para o tratamento da gastrite, asma e reumatismo. No entanto, tem em sua composição química alcaloides pirrolizidínicos, os quais apresentam ação carcinogênica e hepatotóxica (PERON et al., 2008).

A espécie *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) é conhecida popularmente como espirradeira. Esta planta apresenta em sua composição química glicosídeos cardíacos, os quais estão associados ao potencial de toxicidade apresentado por esta espécie vegetal. Os efeitos clínicos decorrentes da ingestão desta planta são náuseas, vômitos, arritmias cardíacas e sintomas neurológicos, como desorientação e dor de cabeça. A planta *Rhododendron indicum* (L), conhecida popularmente como azaléia é outro exemplo de plantas que apresentam elevada toxicidade. Seus efeitos tóxicos são causados pela presença de diterpenos derivados do andromedano, os quais apresentam efeitos cardiotoxícos (SIMÕES et al., 2010).

Algumas substâncias extraídas de plantas podem causar danos ao material genético e desta forma, contribuir para o surgimento de mutações. Qualquer substância capaz de causar danos no DNA ou RNA das células é considerada genotóxica. Apesar do grande uso das plantas na medicina popular ainda se tem um conhecimento limitado sobre seus possíveis potenciais genotóxicos (FONSECA; PEREIRA, 2004). O estudo da genotoxicidade das plantas utilizadas popularmente se faz importante na pesquisa por novos fármacos com potencial quimioterapêutico e como uma medida de segurança para seu uso. Apesar da toxicidade apresentada por algumas espécies vegetais, as mesmas servem como precursores de substâncias com atividade terapêutica. O avanço nas pesquisas tem permitido a síntese e

modificações de estruturas ativas, podendo desta forma obter produtos com maior atividade terapêutica e menor toxicidade (VARANDA, 2006).

Assim como os medicamentos sintéticos, as plantas medicinais possuem compostos farmacologicamente ativos que, quando administrados, desenvolvem efeitos no organismo. Por isso, o uso terapêutico destas espécies exige estudos detalhados, a fim de avaliar suas potencialidades terapêuticas e toxicológicas para que sejam aplicadas em formulações adequadas para uso eficaz e seguro (PERON et al., 2008). Quando se tem a finalidade de aplicação clínica de um novo fármaco ou de uma planta, os estudos sobre o equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos são de crucial importância, ainda que nos estágios iniciais da pesquisa (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007).

Testes de mutagenicidade são realizados com a finalidade de analisar alterações cromossômicas em sistemas expostos a substâncias com potencialidades mutagênicas ou carcinogênicas. Para que esta avaliação ocorra, é necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, uma vez que, a partir disso se torna possível identificar os efeitos toxicológicos, bem como, as alterações ocorridas ao longo do ciclo celular. Tendo em vista o fato de que o índice mitótico e o índice de replicação são utilizados como indicadores de proliferação celular, o teste em *Allium cepa* tem sido diversamente utilizado com a finalidade de avaliar a genotoxicidade de plantas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; VERRI; MOURA; MOURA, 2017).

O bioensaio com *Artemia salina* Leach é um método realizado com objetivo de detectar compostos bioativos em extratos de plantas. A avaliação da toxicidade a partir deste teste mostrou uma excelente correlação com atividade antitumoral (citotóxica). O Instituto Nacional do Câncer (NCI, EUA) mostrou essa correlação significativa entre o ensaio com *A. salina* e o ensaio de inibição do crescimento *in vitro* de tumor sólido humano. Desta forma, o teste com *A. salina* pode ser utilizado como ferramenta de pré-seleção para pesquisa de novas drogas com potencial antitumoral (ARCANJO et al., 2012).

A toxicidade aguda e de doses repetidas (28 dias) são metodologias amplamente utilizadas para avaliar e classificar substâncias quando ao seu potencial de causar danos em organismos vivos e desta forma oferecer dados para o estabelecimento de parâmetros de segurança (CUNHA et al., 2013). Na toxicidade aguda a substância é administrada uma única vez, podendo assim avaliar a mortalidade dos animais. Nos demais ensaios de toxicidade de doses repetidas e

crônica o tempo de exposição é maior e utiliza diferentes doses para diferentes grupos (OECD, 1995; OECD, 2001). Diferentemente da toxicidade aguda, na toxicidade de doses repetidas é possível verificar os efeitos tóxicos a longo prazo. Diversos fatores podem influenciar na toxicidade de uma substância, como por exemplo, a sua concentração e a sua interação com os tecidos vivos. Desta forma, metodologias *in vivo* utilizando animais roedores são de grande importância e ainda não podem ser completamente substituídos (BEDNARCZUK et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição fitoquímica, a atividade antioxidante e parâmetros de toxicidade de *Leandra australis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar os principais metabólitos secundários no extrato e frações de *L. australis*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e frações *in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato em *Artemia salina*;
- Avaliar a genotoxicidade do extrato em *Allium cepa*
- Verificar o potencial tóxico agudo e de doses repetidas de 28 dias do extrato de *L. australis* em ratos *Wistar*.

4 MANUSCRITO

As metodologias utilizadas, os resultados e discussões deste trabalho estão apresentadas na forma de manuscrito. O manuscrito foi submetido ao periódico *Natural Product Research*. Este trabalho está de acordo com as normas de submissão do periódico escolhido para publicação.

***Leandra australis*: A potent antioxidant species with low toxicity that is composed of polyphenols**

***Thainara de Andrade Fortes*^{1*}, *Pâmila Pinheiro da Fontoura*³, *Jéssica Santos da Silva*³, *Patrícia da Silva Pacheco*³, *Lenise de Lima Silva*³, *Camille Gaube Guex*¹, *Kássia Caroline Figueredo*¹, *Patrícia Romualdo de Jesus*¹, *Ana Martiele Engelmann*², *Cinthia Melazzo de Andrade*², *Amanda Leitão Gindr*³, *Liliane de Freitas Bauermann*¹.**

¹*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

²*University Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

³*Faculty of Pharmacy, Integrated Regional University of High Uruguay and Missions, Santiago Campus, Santiago, RS, Brazil.*

*Corresponding author: Thainara de Andrade Fortes. E-mail: fortesthainara@gmail.com

ABSTRACT

Leandra australis, which is popularly known as “pixirica” in Brazil, has historically been used for the treatment of inflammatory diseases and diabetes and for weight loss. In this study, we dried and ground the aerial parts of this plant, extracted the product using maceration, and used solvents of increasing polarity to fractionate the chemical components. The samples were evaluated using HPLC-DAD-MS, in addition to colorimetric methods (UV-Vis spectrophotometry). The antioxidant activity was evaluated by β -carotene, FRAP, and DPPH assays. A preliminary toxicity profile was obtained using alternative methods that employed *Artemia salina* and *Allium cepa*. In addition, toxicity in *Wistar* rats was evaluated. The plant displayed a high content of phenolic compounds and condensed tannins, and it was possible to quantify gallic acid (19.32 ± 0.39 mg/g), rutin (12.30 ± 0.01 mg/g) and quercetin (162.58 ± 0.68 mg/g) in the crude extract. This species also possessed considerable antioxidant activity. While no cytotoxicity was observed for *A. salina*, genotoxic and anti-proliferative activity were found. The evaluation of toxicity in *Wistar* rats showed low toxicity, and the doses administered did not cause death or signs of toxicity.

Keywords: pixirica; polyphenols; condensed tannins; genotoxic species; anti-proliferative activity

Introduction

There has been great progress in the development of new drugs, but medicinal plants are still widely used. This practice covers all social classes and that is why it is important that plants are used safely and effectively (Santana et al., 2018). The plants initially were used in their natural form, in the preparation of teas, and more recently, as important tools for the study and development of new medicines (Yunes and Cechinel Filho 2014). The pharmaceutical industry continually seeks to develop new products and with the advancement of research using natural products there is the possibility of modifying the structure of these compounds so that they have greater effectiveness in their pharmacological activities and less toxicity (Yunes and Cechinel Filho 2014, Villas Boas et al 2018). The species *Leandra australis* (Melastomataceae) is known as “pixirica” and popularly used to diabetes, inflammatory diseases, hypercholesterolemia, bronchitis, and urinary and renal problems, in addition to aiding weight loss (Ceolin et al. 2011). This work aims to evaluate the chemical composition, antioxidant activity, and toxicity of *L. australis*.

Results and Discussion

The extraction process of *L. australis* gave the following yields: CE: 14.24%; HeOH: 3.67%; CHCl₃: 2.58%; EtOAc: 4.77%; BuOH: 18.35%; and AR: 26.77%, what indicated that was a predominance of polar chemicals in the plant. An extractive solvent with greater polarity is known to improve the extraction of phenolic and/or heterosides compounds, such as flavonoids, tannins, and saponins (Gontijo et al. 2014). This explains the higher yield obtained for the AR and BuOH and the phytochemical analysis of the CE that revealed the presence of condensed tannins, flavonols, free steroids, triterpenes, and saponins. Flavonoids, tannins, free steroids (Alice, 1995), triterpenoids and saponins (Clemes et al. 2008) were already described to this plant.

The concentration of polyphenols, flavonoids, condensed tannins and alkaloids range 366.36 - 33.71; 34-3.4; 190.7- 6.93; 10.70-0.13 mg/g am, respectively (Table 1). This confirmed the presence of this group of metabolites as previously described for the family Melastomataceae (Leite 2009).

An analysis of CE from *L. australis* using HPLC-DAD-MS quantified gallic acid (19.32±0.39 mg/g extract), rutin (12.30±0.01 mg/g extract), and quercetin (162.58±0.68 mg/g) (Figure S1). These compounds were already described to Melastomataceae family (Rodrigues et al. 2008; Pieroni et al. 2011).

The evaluation of antioxidant activity using β-carotene (Table 2) showed a high inhibition of oxidation to BuOH (90.31%) and EtOAc (84.54%). FRAP evaluated antioxidant activity based upon the ability to reduce Fe³⁺ ions, which demonstrates the potential of a sample to act as a reductant (Urrea-Victoria et al. 2016). In our study, the highest antioxidant activity was obtained for EtOAc (12.94 mM of ferrous sulfate), followed by AR (7.51 mM of ferrous sulfate) and CE (5.30±0.04 mM of ferrous sulfate). Other studies reported that, when evaluated the antioxidant potential by the reduction of iron (FRAP), quercetin was a highly active flavonoid (Borges 2019) (Firuzi et al. 2005). In our study, we quantified quercetin in CE of *L. australis*, which explains the antioxidant activity obtained for this sample. The DPPH radical capture methodology determines the antioxidant capacity of the sample with regard to the sequestering of the DPPH radical. The best antioxidant activity in this method was observed to EtOAc (IC₅₀ = 5.4 μg/mL) and BuOH (IC₅₀ = 14.7 μg/mL). The extracts of *Dissotis thollonii* (Melastomataceae) had a relevant antioxidant activity in the same method and the same fractions (IC₅₀: 2.11±0.10 and 4.12±0.12 mg/mL for BuOH and EtOAc, respectively) (Nono et al. 2014). The significant antioxidant activity can be attributed to *L. australis* high content of total polyphenols and condensed tannins, and

the presence of gallic acid and quercetin, which are known compounds due to their antioxidant activity (Yunes and Cechinel Filho 2014; Borges 2019).

L. australis had a 50% lethal concentration of microcrustacean nauplii (LC₅₀) of 1,607.15 µg/mL (confidence interval: 1,337.03–1,877.27 µg/mL) against *A. salina*, and sodium lauryl sulfate (SLS - Positive Control) had an LC₅₀ of 57.80 µg/mL (56.1–59.4 µg/mL). Thus, the CE had an LC₅₀ almost 28 times higher than that of the positive control with Sodium Lauryl Sulfate (SLS). According to Meyer et al. (1982) LC₅₀ values greater than 1,000 µg/mL that do not cause the death of more than 50% of the microcrustaceans are not considered toxic.

The genotoxic activity in the *A. cepa* methodology (Figure 1) showed that *L. australis* inhibited the Mitotic Index (MI). The concentrations tested resulted in a significant decrease in MI values compared to the negative control but the plant was not able to cause abnormalities in the cells. However, the absence of observed abnormalities may have resulted from the inhibition of MI, which made it impossible to visualize cell division. The analysis of prevention of damage caused by the herbicide revealed that there is a significant difference between them and the positive control. The prevention of the damage caused may indicate an antitumor action of the plant. Some studies have correlated the cell cycle inhibition of *A. cepa* to tannins content because these metabolites perform enzymatic inhibition (Fachinetto et al. 2007). Thus, it is possible that the MI inhibition observed in the genotoxicity test is due the presence of condensed tannins (Table 1) and/or quercetin, metabolite already described with anti-proliferative potential of quercetin (Kleemann et al. 2011; Yunes and Cechinel Filho 2014). *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) presented anti-proliferative effects in different cancer cells, and were suggested that the antioxidant properties of these extracts contribute directly or indirectly to their anti-proliferative activity (Zakaria et al. 2011).

The evaluation of acute toxicity in *Wistar* rats showed that oral administration of CE from *L. australis* in a single dose (2000 mg/kg) was not able to cause mortality or behavioral changes. According to the OECD 423 protocol, CE from *L. australis* can be included in category 5 and be considered of low toxicity (LD₅₀ estimated between 2000–5000 mg/kg), as there was no death among the animals until the scheduled day for euthanasia. There was no significant difference between the treated animals and the control group in hematological evaluations. However, the assessment of biochemical parameters showed increased levels of BUN (Table 3). Urea and creatinine are biochemical parameters indicative of kidney damage, and they provide important information about the function of this organ (Yang et al 2018; Larsen et al 2016). It is noteworthy that in this work the change in urea levels is not accompanied by changes in creatinine levels. Studies show that flavonoids present in some plants are known to have kidney toxicity (Yang et al 2018). This work identified the presence of flavonoids in the CE from *L. australis* (Table 1). Therefore, this group of secondary metabolites may be responsible for the increase in urea levels.

The liver is an organ directly related to aggressions caused by ingested toxic substances. Therefore, liver parameters must be carefully evaluated after exposure to plants. Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST) and Gamma Glutamyl Transferase (GGT) levels are considered markers of liver damage (Singh et al 2016). The assessment of acute toxicity shows that there was a drop in GGT levels for the group of animals treated with the single dose of 2000 mg/kg (Table 3). And there was no significant difference between groups for ALT and AST levels. These results show that the plant did not show hepatotoxicity. The weights of kidney and liver organs were analyzed and showed no significant difference in relation to the control group, which confirms the low probability of injury to these organs. Our work shows an increase in cholesterol (Chol) levels for

the treated animals (Table 3), but this increase has no clinical significance, as the values are within normal physiological standards for healthy *Wistar* rats (Lima et al 2014).

The study of oral administration in repeated doses of 28 days, involving concentrations of 600, 400 and 200 mg/kg of CE from *L. australis*, did not cause mortality or behavioral changes among the animals. The hematological analysis showed a decrease between the MCV values for male animals (600 mg/kg and 200 mg/kg) and for female animals (400 mg/kg e 200 mg/kg) (Table 5). However, they are not considered signs of toxicity, as the MCV is dependent on the values obtained for RBC (Total red cells count), HCT (Hematocrit) and CHCM (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) (Flores et al 2020), which showed no difference compared to the control group. The reduction in MCV associated with changes in hemoglobin and CHCM are indicative of different types of anemia (Almeida et al., 2017), but in our study these changes did not occur simultaneously.

Knowing that changes in Urea and Creatinine levels are indicative of kidney damage (Yang et al 2018; Larsen et al 2016), this work shows that male animals treated with a dose of 600 mg/kg showed a decrease in BUN levels. Additionally, there were no changes in creatinine levels for both sexes compared to the control group (Table 4). Thus, our results allow us to state that there was no nephrotoxicity after oral administration of *L. australis*. Regarding the parameters responsible for liver function (ALT, AST and GGT) (Singh et al 2016), this work shows that in the group of females treated with the dose of 200 mg/kg there was a decrease in the levels of ALT and AST (Table 5). There was also no significant difference regarding the weight of kidney and liver organs between the studied groups. These results reaffirm the fact that oral administration of CE from *L. australis* did not cause hepatotoxicity and nephrotoxicity when administered continuously.

Conclusions

The species *L. australis* shown considerable antioxidant activity, which was explained by the high content of polyphenols. No cytotoxicity was observed for *A. salina*, but the CE may have some genotoxic and anti-proliferative activity in *A. cepa*, which was explained by the high content of condensed tannins and the phenolic compound quercetin.

Toxicity results in *Wistar* rats showed that CE from *L. australis* administered in a single dose and in repeated doses for 28 days did not cause mortality or behavioral changes in the animals. The hematological parameters were also not changed. The change in Urea levels may be indicative of nephrotoxicity, which may have occurred due to the presence of flavonoids in CE from *L. australis*. Nephrotoxicity may also be related to the acute administration and the higher concentration of CE used in relation to the evaluation of the toxicity of repeated doses of 28 days. However, the absence of mortality and effects considered serious among animals show that the plant had low toxicity. Still, the performance of histopathological studies in organs are important to confirm the renal damage identified in acute toxicity. Other studies on chronic oral toxicity are also important in order to add information about the toxicity profile of the *L. australis* species.

REFERENCES

- ALICE CB. 1995. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. ULBRA.
 ALMEIDA AC, ANDRADE VA, FONSECA FSA, MACÊDO AA, SANTOS RL, COLEN KGF, MARTINS ER. 2017. Acute and chronic toxicity and antimicrobial activity of the and Chinese Herbal Medicine. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 13.
 BORGES ALS. 2019. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da quercetina bioconjugada com pontos quânticos de CdSe de tamanhos mágicos. Universidade Federal de Uberlândia. 1-43.

- by herbal antioxidants: an overview. *Front. Physiol.* 6, 1-18.
- CEOLIN T, BARBIERI RL, HECK RM, PILLON CN, RODRIGUES WF, HEIDEN G. 2011. Plantas medicinais utilizadas pelos agricultores ecológicos na região sul do Rio Grande do Sul. Pelotas: Embrapa clima temperado.
- CLEMES SM, ZENI ALB, KRETZSCHMAR M. 2008. Avaliação química de folhas de plantas medicinais nativas utilizadas no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI). *Rev. Bras. Farm.* 89(1):10-12.
- delivery: Harnessing nature to cure disease. *Mol. Cell. Ther.* 4 (1), 3.
- extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *Pesq. Vet. Bras.* 37(8):840-846.
- FACHINETTO JM, BAGATINI MD, DURIGON J, SILVA ACF, TEDESCO SB. 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev. Bras. de Farmacog.* 17(1):49-54.
- FIRUZI O, LACANNA A, PETRUCCIB R, MARROSUB G, SASOA L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1721:174–184.
- FLORES AG, HUANUIRI K, VASQUEZ J, GUERRA F, MÉNDEZ CF. 2020. Caracterización hematológica de *Astronotus ocellatus* (Cichliformes: Cichlidae): especie de importancia económica en la Amazonía peruana. *Rev Inv Vet Perú* ; 31(2).
- GONTIJO DC, FIETTO LC, LEITE JPV. 2014 Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. *Rev. bras. plantas med.* 16(4):874-880. <https://doi.org/10.2215/CJN.11571017>.
- KLEEMANN R, VERSCHUREN L, MORRISON M, ZADELAAR S, ERK MJV, WIELINGA PY, KOOISTRA T. 2011. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. *Atherosclerosis.* 218:44–52.
- LARSEN MT, KUHLMANN M, HVAM ML, HOWARD KA. 2016. Albumin-based drug
- LEITE TCC. 2009. Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero *Marcetia* (Melastomataceae). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA.
- LIMA CM, LIMA AK, MELO MGM, DÓRIA GAA, LEITE, BLS, SERAFINI RL, ALBUQUERQUE-JUNIOR RLC, ARAÚJO AAS. 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena.* 10 (3): 1-9.
- LIMA DCA. 2011. Estudo comparativo da atividade antioxidante de plantas medicinais da Caatinga utilizadas como anti-inflamatórias. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *JMPR.* 45(5):31-34.
- NONO RN, BARBONI L, TEPONNOA RB, QUASSINTI L, BRAMUCCI M, VITALI LA, PETRELLI D, LUPIDI G, TAPONDJOUA AL. 2014. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities and phytoconstituents of extracts from the roots of *Dissotis thollonii* Cogn. (Melastomataceae). *South African Journal of Botany.* 93:19-26.
- Organization for economic corporation development (OECD), 2001. Guideline 423. Acute oral toxicity- acute toxic class method. 470 adopted by the council on 17th, December 2001.
- PIERONI LG, REZENDE FM, XIMENES VF, DOKKEDAL AL. 2011. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. 16: 9439-9450.
- RODRIGUES J, MICHELIN DC, RINALDO D, ZOCCOLO GJ, SANTOS LC, VILEGAS W, SALGADO HRN. 2008. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). *Journal Of Medicinal Food.* 11(1):120–126.
- SINGH D, CHO WC, UPADHYAY G. 2016. Drug-Induced liver toxicity and prevention
- URREA-VICTORIA V, PIRES J, TORRES PB, SANTOS DYAC, FUNGYI CHOW F. 2016. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. 62(5): 1-6.
- VILLAS BOAS GR, SOUZA DE ARAÚJO FH, MOREIRA MARCELINO J, ALMEIDA CASTRO LH, STEFANELLO APS, SILVA RN, RODRIGUES FS, CARDOSO CAL, BOERNGEN RL, GUTERRES ZDA, OESTERREICH AS. 2018. *Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. *Food Funct.* 9, 3707–3717. <https://doi.org/10.1039/C8FO01017J>.
- YANG B, XIE Y, GUO M, ROSNER MH, YANG H, RONCO C. 2018. Nephrotoxicity
- YUNES RA, CECHINEL FILHO V. 2014. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Univali. Itajaí (SC).
- ZAKARIA ZA, ROFIEE MS, MOHAMED AM, TEH LK, SALLEH MZ. 2011. *In Vitro* Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies.* 4(4):248-256.

Table 1: Secondary metabolites of *Leandra australis*.

Sample	Total polyphenols (mg E.A.G./g) ± SD	Flavonoids (mg E.Q./g) ± SD	Condensed tannins (mg E.C./g) ± SD	Alkaloids (mg E.A./g) ± SD
CE	338.01 ± 2.87 ^b	10.9 ± 0.64 ^c	190.7 ± 1.7 ^a	10.70 ± 0.38 ^a
HeOH	33.71 ± 2.25 ^f	18.7 ± 0.35 ^b	6.93 ± 2.5 ^d	6.41 ± 0.02 ^b
CHCl ₃	45.16 ± 0.62 ^e	34 ± 0.62 ^a	81.43 ± 14 ^b	0.53 ± 0.0 ^c
EtOAc	366.36 ± 0.23 ^a	19.1 ± 0.41 ^b	84.76 ± 2.8 ^b	0.13 ± 0.01 ^c
BuOH	159.54 ± 5.36 ^d	3.4 ± 0.42 ^d	46.23 ± 2.3 ^c	0.34 ± 0.02 ^c
AR	221.71 ± 0.40 ^c	4.9 ± 1.1 ^e	54.76 ± 3.1 ^c	0.34 ± 0.13 ^c

G.A.E: gallic acid. SD: Standard deviation. Q: quercetin. C.: catechin. A.: alkaloids. ANOVA followed by Tukey test. The values were significantly different when $p < 0.05$. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$).

Table 2: Antioxidant activity of *Leandra australis*.

Sample	β- Caroteno Average ± SD (%)	FRAP Average ± SD (mM of ferrous sulphate)	DPPH IC ₅₀ ± SD (µg/mL)
CE	78.54 ± 4.63 ^b	5.30 ± 0.04 ^c	24.5 ± 0.63 ^c
HeOH	28.94 ± 3.40 ^c	3.58 ± 0.02 ^e	121.0 ± 19.9 ^{b,c}
CHCl ₃	44.86 ± 5.25 ^c	0.63 ± 0.03 ^f	82.7 ± 51.34 ^{b,c}
EtOAc	84.54 ± 2.04 ^{a,b}	12.94 ± 0.15 ^a	5.4 ± 0.44 ^c
BuOH	90.31 ± 1.45 ^a	4.28 ± 0.07 ^d	14.7 ± 0.4 ^c
AR	79.34 ± 1.72 ^b	7.51 ± 0.04 ^b	639.8 ± 60.4 ^a

ANOVA followed by Tukey test. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$).

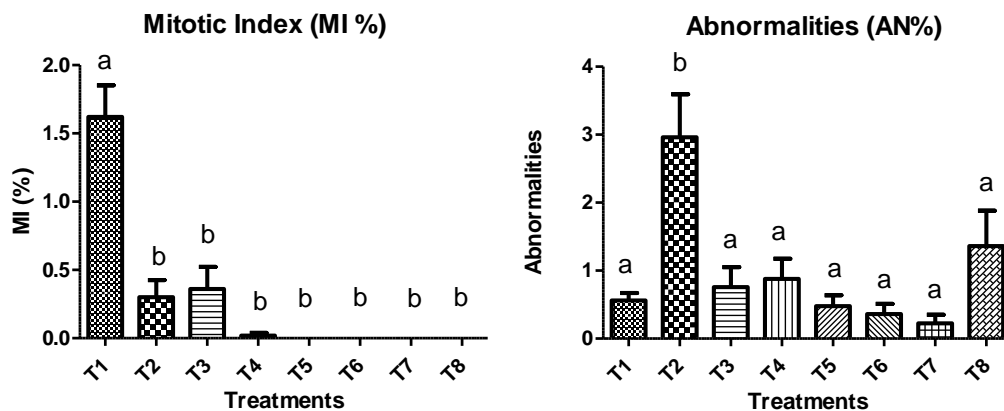


Figure 1: Genotoxicity of *L. australis* on *A. cepa* root cells. T1- Negative control; T2- Positive control T3- CE 1000 µg/mL; T4- CE 2000 µg/mL; T5- CE 4000 µg/mL; T6, T7 and T8- Damage prevention with CE 1000, 2000 and 4000 µg/mL. ANOVA followed by Tukey test. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$).

Table 3: Parameters altered after acute administration of CE *L. australis* 2000 mg/kg in rats.

Parameters	Control	CE of <i>L. australis</i> 2000 mg/kg
BUN (mg/dL)	49.66 ± 2.42	57.80 ± 3.27*
GGT (U/L)	3.50 ± 2.34	1.00 ± 1.09*
Chol (mg/dL)	62.83 ± 4.79	71.40 ± 5.85*

Data are expressed as mean ± S.D. Student T test/Mann-Whitney. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. (*) Different from the control.

Table 4: Effects of administration of CE *L. australis* for 28 days on hematological parameters in rats.

Hematological parameters	Control	600 mg/kg	400 mg/kg	200 mg/kg
<i>Male</i>				
RBC (10 ⁶ /μL)	7.30±0.16	7.63±0.36	7.36±0.12	7.80±0.21
HBG (g/dL)	16.26±0.60	16.42±0.90	16.36±0.27	16.52±0.72
HCT (%)	45.54±1.35	45.88±2.34	46.10±0.52	46.72±1.96
MCV (fL)	62.38±0.65	60.18±1.36*	62.70±0.80	59.94±1.37*
MCHC (g/dL)	35.66±0.84	35.74±0.19	35.46±0.43	35.30±0.46
PLT (μL)	74300±30479.50	812800±65522.52	780000±35376.55	790800±68696.43
TPP	6.48±0.10	6.52±0.36	6.04±0.26	6.20±0.46
TL (μL)	8460±1262.14	8260±1432.82	6500±380.78	7640±1566.20
BC (%)	00±00	00±00	00±00	00±00
Neutrophils (%)	16.20±3.11	16.00±5.52	21.00±4.47	17.20±4.20
Lymphocytes (%)	80.80±5.01	79.20±5.71	75.20±3.63	78.80±7.04
Monocytes (%)	2.40±2.30	4.00±2.54	3.00±1.58	3.80±3.56
Eosinophils (%)	0.60±0.89	0.80±0.44	0.80±0.83	0.20±0.44
Basophils (%)	00±00	00±00	00±00	00±00
<i>Female</i>				
RBC (10 ⁶ /μL)	7.04±0.18	7.37±0.22	7.76±0.48	7.58±0.26
HBG (g/dL)	16.12±0.46	16.63±0.37	17.22±0.98	16.64±0.64
HCT (%)	43.74±0.96	44.66±1.00	46.18±2.43	44.88±1.44
MCV (fL)	61.90±1.02	60.70±1.38	59.56±1.11*	59.26±0.91*
MCHC (g/dL)	36.82±0.41	37.16±0.37	37.24±0.68	37.02±0.63
PLT (μL)	835400±36630.59	940000±35028.56	937200±62679.34	1025200±210930.60
TPP	7.04±0.16	7.13±0.46	7.24±0.43	6.80±0.24
TL (μL)	5860±2495.59	5800±360.55	7440±2161.71	6800±1288.41
BC (%)	00±00	00±00	0.20±0.44	00±00
Neutrophils (%)	14.80±1.48	15.66±4.50	12.40±2.79	23.20±9.52
Lymphocytes (%)	82.00±2.23	83.00±4.00	86.20±2.38	75.80±9.73
Monocytes (%)	2.40±1.81	1.00±1.00	0.40±0.54	0.40±0.54
Eosinophils (%)	0.80±0.83	0.33±0.57	0.80±0.83	0.60±0.89
Basophils (%)	00±00	00±00	00±00	00±00

Results are expressed as mean±S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's. The values were significantly different when p<0.05. (*) Different from the control.

Table 5: Effects of administration of CE *L. australis* for 28 days on biochemical parameters in rats.

Biochemical parameters	Control	600 mg/kg	400 mg/kg	200 mg/kg
<i>Male</i>				
ALB (g/dL)	2.65±0.05	2.56±0.05	2.60±0.12	2.57±0.12
ALT (UI/L)	47.25±8.99	42.40±5.31	43.80±8.70	37.25±9.53
AST (UI/L)	103.25±11.70	96.80±11.71	103.00±16.52	77.25±8.34
FA (UI/L)	133.75±10.56	113.80±35.49	125.20±19.94	111.00±16.53
CRE (mg/dL)	0.67±0.05	0.64±0.05	0.70±0.07	0.60±0.00
BUN (mg/dL)	38.75±2.21	30.00±4.69*	35.40±5.17	39.25±3.40
GGT (U/L)	0.25±0.50	0.40±0.89	0.60±0.89	1.25±1.89
TPP (g/dL)	5.95±0.05	5.84±0.05	5.72±0.34	6.02±0.17
TRL (mg/dL)	101.25±26.38	117.80±29.64	89.00±13.76	76.00±16.91
Chol (mg/dL)	69.00±10.98	66.20±6.30	66.60±7.92	85.00±17.00
GLU(mg/dL)	222.00±79.93	190.00±46.04	264.60±63.66	207.25±26.15
<i>Female</i>				
ALB (g/dL)	2.74±0.15	2.80±0.17	2.82±0.13	2.78±0.21
ALT (UI/L)	45.60±7.79	42.00±3.60	38.80±4.81	31.00±2.23*

AST (U/L)	103.00±16.55	99.33±10.69	87.40±18.87	71.60±4.92*
FA (U/L)	95.80±27.68	58.33±17.00	79.80±15.35	62.80±10.75
CRE (mg/dL)	0.72±0.04	0.73±0.05	0.70±0.00	0.66±0.05
BUN (mg/dL)	43.40±7.50	32.33±5.77	38.20±4.32	37.40±9.18
GGT (U/L)	0.20±0.44	1.00±1.00	1.40±2.60	0.80±0.83
TPP (g/dL)	6.24±0.15	6.16±0.35	6.46±0.37	6.30±0.46
TRL (mg/dL)	91.80±20.09	91.66±33.08	115.40±41.18	92.80±34.80
Chol (mg/dL)	78.40±8.35	79.00±4.58	84.00±8.33	75.60±5.59
GLU (mg/dL)	235.80±44.49	226.00±30.51	224.40±54.23	265.20±31.13

Results are expressed as mean±S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's. The values were significantly different when $p < 0.05$. (*) Different from the control.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

***Leandra australis*: A potent antioxidant species with low toxicity that is composed of polyphenols**

***Thainara de Andrade Fortes*^{1*}, *Pâmila Pinheiro da Fontour*³, *Jéssica Santos da Silva*³, *Patrícia da Silva Pacheco*³, *Lenise de Lima Silva*³, *Camille Gaube Guex*¹, *Kássia Caroline Figueredo*¹, *Patrícia Romualdo de Jesus*¹, *Ana Martiele Engelmann*², *Cinthia Melazzo de Andrade*², *Amanda Leitão Gindr*³, *Liliane de Freitas Bauermann*¹.**

¹*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

²*University Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

³*Faculty of Pharmacy, Integrated Regional University of High Uruguay and Missions, Santiago Campus, Santiago, RS, Brazil.*

*Corresponding author: Thainara de Andrade Fortes. E-mail: fortesthainara@gmail.com

EXPERIMENTAL SECTION

Plant material

The aerial parts (150 grams) of *Leandra australis* were collected in March 2015, in the city of Jaguari, midwestern region of Rio Grande Sul, Brazil (29 ° 29 '44.927 "N -54 ° 41' 12.523" E). The plant was identified by the botanists Msc. Nelci Rolin Bastos Záchia and Dr. Renato Záchia, from the Federal University of Santa Maria (UFSM, RS, Brazil), and the voucher specimen was deposited at the Herbário do Departamento de Biologia da UFSM under the registration number: SMDB 17.754 and at the Padre Balduino Rambo Herbarium, located at the Integrated Regional University of Alto Uruguay Missions (URI), Campus of Erechim, under the registration number: HPBR 11.934.

Extraction of Plant material and fractions

The plant was subjected to the maceration process with ethyl alcohol 50%, for two months. The maceration was shaken daily with weekly solvent filtration and renewal. The resulting hydroalcoholic extract from the filtrate was evaporated in a rotary evaporator under vacuum and at a temperature below 45°C. Subsequently, the yield of the crude extract was determined from its dry weight. The dry crude extract (CE) was then fractionated with solvents of increasing polarity: hexane (HeOH), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH). At the end of this process, the remaining extract was taken to dryness to give the aqueous residue (AR).

Determination of total polyphenols content

The determination of phenolic compounds was performed according to the method described by Gindri et al. (2014). Thus, Folin Ciocalteu 2N reagent and sodium carbonate 20% solution were used, with a subsequent Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) reading in 750nm. Samples (50 µg/mL) of the extract, fractions and aqueous residue were diluted in distilled water and the test was made in triplicate. For the quantification of polyphenols an analytical curve was used with gallic acid (10 - 30 µg/mL - $y = 0.0489x + 0.0059$, $R^2 = 0.9986$). The results are expressed in mg of gallic acid equivalents (G.A.E.)/g of extract or fraction.

Determination of total flavonoids content

For the determination of the flavonoids, a aluminum chloride 2% solution was used, according to the colorimetric method described by Gindri et al. (2014). Dilutions of the extract, fractions and aqueous residue samples (125 µg/mL) were done with ethanol and the test was performed in triplicate. Subsequently, the Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) was read in 425 nm. For the quantification was used an analytical curve of quercetin (2 - 18 µg/mL - $y = 0.0487x - 0.0365$, $R^2 = 0.9989$). The results are expressed in mg of quercetin equivalents (Q.E.)/g of extract or fraction.

Determination of condensed tannins content

The determination of condensed tannins occurred according to the method described by Gindri et al. (2014) using hydrochloric acid 8% solution and vanillin 1% solution. Samples of the extract, fractions and aqueous residue were prepared at the concentration of 30 mg/mL, except for the HeOH fraction, which was prepared at a concentration of 20 mg/mL. The samples were diluted in methanol and the reading was done in Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) at 500 nm. The assay was performed in triplicate and for the calculation of the determination of the condensed tannin content an analytical curve was used with the standard catechin (30 µg/mL - $y = 0.0193x + 0.0177$, $R^2 = 0.9896$). The results are expressed in mg of catechin equivalents (C.E.)/g of extract or fraction.

Determination of alkaloids content

The determination of alkaloids followed the technique described by Oliveira et al. (2006). Samples (30 mg/mL) of the extract, fractions and aqueous residue were diluted in distilled water. For the test, Dragendorff reagent, sodium sulfite 1% and nitric acid concentrated were used. The reading was performed in a Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) at 435 nm. The test was carried out in triplicate

and for the calculation of the alkaloid content an analytical curve was used bismuth nitrate (10 a 90 $\mu\text{g/mL}$) ($y=2.2783x+0.0361$, $R^2=0.9994$). The results are presented in mg of alcaloids (A.)/g of extract or fraction.

Determination of chemical composition by HPLC-DAD-MS

The identification and quantification of the secondary metabolites of *L. australis* crude extract followed the methodology proposed by Vieira et al. (2001), with minor modifications. High Performance Liquid Chromatography coupled with a Mass Spectrometry Detector (HPLC-DAD-MS) corresponded to a Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an Auto-Sampler (SIL-20AHT), two Shimadzu LC-20ADT reciprocating pumps connected to the degasser DGU20A3R, integrator CBM20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A, and oven CTO-20A.

The HPLC system was coupled to the compact quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass analyzer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), which was controlled using OtofControl Software. The parameters for analysis were set using negative ion modes with spectra acquired over a large range from 50 to 1200 m/z. The optimum values of the ESI-MS parameters were a capillary voltage of 4500V, drying gas temperature of 215°C, drying gas flow of 10.0 L/min, nebulising gas pressure of 5.0 Bar, collision RF of 150 Vpp, transfer time of 70 ls, and a pre-pulse storage of 5 ls. Additionally, automatic MS/MS experiments were performed using nitrogen as collision gas and by adjusting the collision energy values as follows: m/z 100, 20 eV; m/z 500, 30 eV; and m/z 1000, 35 eV. The MS data was analyzed using Data Analysis 4.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Analyses were carried out within the C-18 column (4.6 mm x 250 mm, Merck, Germany) packed with 5 μm diameter particles and within the C-18 pre-column (RP 18 5 μm , Merck, Alemanha). The first mobile phase, phase A, was two percent acetic acid at a pH of 4.2. The second mobile phase, phase B, used methanol, acetic acid, and distilled water at a ratio of 18:1:1, respectively. The gradient elution was 0 min: 20% of B, 0-25 min: 50% of B, 25 min: 20% of B, 30 min: 20% of B (end of run), at the flow rate of 0.8 ml/min. The peaks were identified by comparing the present results with the retention times and mass spectrums from the software library and external standards. The external standards included a 40% isoflavone pool (Daidzin: 3.1%, Glycitin: 1.56%, Genistin: 0.98%, Daidzein: 35.49%, Glycitein: 0.1%, and Genistein: 0.03% - Dongming Hui ren Biological Products, Shandong, China) between 0.156–2.34 mg/mL of glycitin, 3.5–53.2 mg/ml of daidzein, 3–4.5 $\mu\text{g/mL}$ of genistein, and levels of caffeic acid, gallic acid, clorogenic acid, catequin, luteolin, cumarin, quercetin and rutin (all standards by Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) between 1.5 and 24 $\mu\text{g/mL}$. The samples (CE of *L. australis*) and standards were tested in triplicate. The results are presented as mean \pm standard deviation.

Determination of antioxidant capacity

Method of capturing the radical DPPH (2,2- difenil-1- picrilhidrazil)

The evaluation of the antioxidant capacity by the colorimetric method of capture of the DPPH radical was carried out according to the methodology described by Mensor et al. (2001). Samples of the extract, fractions and aqueous residue were evaluated at the concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81 $\mu\text{g/mL}$. The assay was performed in triplicate and dilutions in ethanol. The samples were read on a Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) at 518 nm. The percent inhibition of the DPPH radical was calculated by Equation 1, described below:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{[(\text{Abs. sample} - \text{Abs. white}) \times 100]}{\text{Abs. control}}$$

Equation 1: Calculation of percentage of inhibition. Where: Abs. Sample is the absorbance of the crude extract/fractions; Abs. White is the absorbance of crude extracts/fractions without addition of DPPH solution, and Abs. Control is the absorbance of the DPPH solution in ethanol.

After the calculations, a graph was constructed with the percentage of inhibition versus concentration of the extract and the equation of the line was calculated, which was used to calculate the IC₅₀ (effective concentration to obtain 50% of antioxidant activity of the plant versus the radical DPPH).

Antioxidant power of Fe³⁺ reduction (FRAP)

The FRAP methodology was performed according to the description of Benzie and Strain (1996), with minor modifications. Samples of the extract, fractions and aqueous residue (1000 µg/mL) were diluted in distilled water. The working FRAP reagent was produced by mixing 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 2,3,4-triphenyltetrazolic acid (CTT) 10mM solution and FeCl₃.6H₂O 20 mM in a 10:1:1 ratio prior to use and heated to 37°C in a water bath. The test was performed in triplicate from the addition of 200 µL of the sample and 1800 µL of FRAP reagent. Subsequently, the samples were stored in water bath (37°C) for four minutes. The reading was performed in Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) at 593 nm. A standard curve of ferrous sulphate at concentrations of 1000 up to 62.5 mmol/L ($y = 0.000049x + 0.036181$, $R^2 = 0.992190$) was used to the quantification of the power of Fe³⁺ reduction and the results was expressed in mM ferrous sulfate.

Antioxidant activity by the co-oxidation test with beta-carotene and linolenic acid

The co-oxidation test with beta-carotene and linolenic acid was performed according to the methodology described by Duarte-Almeida et al. (2006). Samples of the extract, fractions and aqueous residue (500 µg/mL) were diluted in methanol and heated to 45°C in a water bath. The test was performed in triplicate and with immediate reading (at time zero) and after, consecutive readings every 15 minutes until the time of 120 minutes of reaction. The readings were carried out in a Spectrophotometer UV-Vis (Spectroquant® Pharo 100, Merck) at 470 nm. The percent inhibition of the beta-carotene oxidation was performed from Equation 2, described below:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{Ac} - \text{Aam}) \times 100]}{\text{Ac}}$$

Equation 2: Calculation of percent inhibition. Where: Ac = initial ABS (control) - final ABS (control) and Aam = initial ABS (sample) - final Abs (sample).

Toxicity assessment

Artemia salina (Leach) assay

The larvae of *A. salina* (60 milligrams) were hatched under temperature between 22-29 °C in artificial saline (23 g/L of sea salt and 0.7 g/L of sodium bicarbonate in distilled water) according to the methodology described by Silva et al. (2010). After 24 hours, ten nauplii were transferred to the test tube containing 9 mL of artificial saline and 1 mL of the sample tested. The test was performed in triplicate and with two replicates. After 24 hours, the counts of live and dead nauplii occurred. For the test three different sample concentrations (1000, 2000 and 4000 µg/mL) were used. As a negative control, only artificial saline was used and Sodium Lauryl Sulfate (100, 10 and 1µg/mL) was used as the positive control.

Allium cepa assay

The evaluation of genotoxicity and/or genoprotection was performed only for CE of *L. australis*, following the technique described by Tedesco and Laughinghouse (2012). Thus, 8 groups of 5 bulbs were placed to rooting in distilled water and after rooting (48-72 hours) were submitted to the following treatments:

- T1 Negative control in distilled water;
- T2 Positive control Glyphosate 2%;
- T3 CE at 1000 µg/mL;
- T4 CE at 2000 µg/ml;
- T5 CE at 4000 µg/mL;
- T6 Evaluation of the recovery of the damage of glyphosate 2% with CE at 1000 µg/mL;
- T7 Evaluation of the recovery of the damage of glyphosate 2% with CE at 2000 µg/mL;
- T8 Evaluation of the recovery of the damage of glyphosate 2% with CE at 4000 µg/mL.

The groups (T1 to T5) were placed in contact with CE of the plant for 24 hours. Next, the rootlets were fixed in ethanol-acetic acid (3:1) for 24 hours. After this period, they were removed from the fixative, collected and kept in ethyl alcohol 70% in the refrigerator until use. Differently, the groups T6, T7 and T8 after rooting in distilled water were placed in contact with a solution containing crude extract of the test plant for 24 hours. After this period, the bulbs were left in a solution of glyphosate 2% for another 24 hours.

In the slides were observed the different phases of the cell cycle (interphase, prophase, metaphase, anaphase, telophase) and possible cellular abnormalities. 1000 cells were analyzed per bulb, totaling 5000 cells per treatment. Subsequently, mean cell number values of each of the cell cycle phases of *A. cepa* were calculated. The determination of the Mitotic Index (MI) and the percentage of Abnormalities (AN) was performed according to Equation 3 and Equation 4, respectively.

$$MI = \frac{\text{Number total of cells (cells in interphase + cells in division)}}{\text{Number of cells in interphase}} \times 100$$

Equation 3: Calculation made to obtain the Mitotic Index (MI).

$$AN \% = \frac{\text{Abnormalities}}{\text{Number total of cells}} \times 100$$

Equation 4: Calculation made to obtain the Abnormalities (AN).

Toxicity in Wistar rats

Animals

Wistar rats of both sexes were used, females weighing between 80 – 160g and males weighing between 100 – 200g from the Central Animal Facility of the Federal University of Santa Maria (UFSM). The animals were randomly distributed into different experimental groups and kept in the vivarium of building 21 in cages, at a controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), on a 12 hours light/dark cycle and with free access to standard chow and water. All experimental protocols were forwarded and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFSM) under number 2204200419.

Evaluation of the acute toxicity test

According to the guidelines of OECD 423, the extract of *L. australis* was administered in a single dose of 2000 mg/kg in rats (n=3 per group), orally (gavage). The control group received water (2 mL/kg), also orally. The weight of each animal was determined shortly before the plant extract was administered, and daily throughout the study period. After administration, the animals were observed individually at least once during the first 30 minutes, periodically during the first 24 hours, with special attention during the first 4 hours, and then daily, totaling 14 days. The observations included alterations in the skin, hair, eyes, mucous membranes of the respiratory system and in the circulatory, autonomic and central nervous systems, in addition to behavior. Attention will be directed to the observation of tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, sleep and coma.

On the 15th day, the animals were anesthetized with thiopental 25 mg/kg i.p., followed by analgesia with tramadol 8mg/kg i.p. and blood was collected by cardiac puncture, followed by euthanasia with deepening of the anesthetic (thiopental 150 mg/Kg i.p.), and death was confirmed by observation of respiratory arrest for more than 180 seconds. The collected blood was used to perform biochemical and hematological tests.

Evaluation of the toxicity of repeated doses of 28 days

As per OECD 407 guidance, the plant extract was administered orally (gavage), daily in the morning, for 28 days. Twenty male rats (n=5 per group) and 20 female rats (n=5 per group) were used. The animals were divided into the following experimental groups:

- Control group: received distilled water;
- Group II: received CE of *L.australis* 600 mg/kg;
- Group III: received CE of *L.australis* 400 mg/kg;
- Group IV, received CE of *L. australis* 200 mg/kg.

Physiological data such as weight and abnormal behavioral changes were observed throughout the study. On the 29th day, the animals were euthanized as described in the item above (Evaluation of the acute toxicity test). The animals' blood was collected to perform the biochemical and hematological tests.

Biochemical and Hematological Analysis

Biochemical analyzes were performed using a commercial kit (Bioclin®) with animal serum samples and according to the manufacturer's instructions. The samples were processed in an automatic biochemical analyzer (Mindray BS-120®). The following biochemical parameters were analyzed: Albumin (ALB), Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Alkaline phosphatase (FA), Creatinine (CRE), Blood urea nitrogen levels (BUN), Gamma Glutamyl Transferase (GGT), Total Protein (TPP), Triglycerides (TRL), Cholesterol (Chol) and Blood sugar levels (GLU).

Hematological analysis was performed in an electronic counter (BC-2800 Vet – Auto Hematology Analyser, Mindray®) from samples packed in tubes containing EDTA. The following hematological parameters were determined: Total red cell count (RBC), Hemoglobina (HBG), Hematócrit (HCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobina Concentration (MCHC), Platelet (PLT), Total Protein (TPP), Total Leukocytes (TL), Band cell (BC), Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, and Basophils.

Statistical analysis

For the quantifications of secondary metabolites, antioxidant capacity evaluation and genotoxicity in *Allium cepa*, the one-way ANOVA was used. The averages were compared using the Tukey test, considering a level of significance of $p < 0.05$. In the assay with *Artemia salina* the samples were evaluated through the Probitos analysis. The statistical tests were performed in software Statistica® (Statsoft, version 7.0), except the genotoxicity test that had the statistics analysis and graphs were performed in the program GraphPad Prism® (version 5.0).

To assess toxicity in *Wistar* rats, differences among groups were determined by Student's test and one-way analysis of variance, followed by Tukey post-hoc test. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Dunn's were used as statistic tests when the requirements to perform a parametric test were not satisfied (The statistical tests were performed in software Statistica® (Statsoft, version 7.0). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

REFERENCES

- BENZIE IFF, STRAIN JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70–76.
- DUARTE-ALMEIDA JM, SANTOS RJ, GENOVESE MI, LAJOLO FM. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas. 26(2):446-452.
- GINDRI AL, DE SOUZA LB, CRUZ RC, BOLIGON AA, MACHADO MM, ATHAYDE ML. 2014. Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Ureca baccifera* Gaudich (Urticaceae). *Natural Product Research*, 28(23):2214–2216.
- MATOS FJ. 2009. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza. UFC.
- MENSOR LL, MENEZES FS, LEITÃO GG, REIS AS, DOS SANTOS TC, COUBE CS, LEITÃO SG. 2001. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Research*, 15(2):127-130.
- Organization for economic corporation development (OECD), 1995. Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. 468 adopted by the council on 27th, July 1995.
- Organization for economic corporation development (OECD), 2001. Guideline 423. Acute oral toxicity- acute toxic class method. 470 adopted by the council on 17th, December 2001.
- OLIVEIRA MAC, ALBUQUERQUE MM, XAVIER HS, STRATTMANN RR, GRANGEIRO JÚNIOR S, & QUEIROZ AT. 2006. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcalóides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(3):357-364.
- SILVA LL, HELDWEIN CG, REETZ LGB, HÖRNER R, MALLMANN CA, HEINZMANN BM. 2010. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(5):700-705.
- TEDESCO BS, LAUGHINGHOUSE HD. 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*.
- VIEIRA RF, GRAYER RJ, PATON A, SIMON, JE. 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3):287-304.

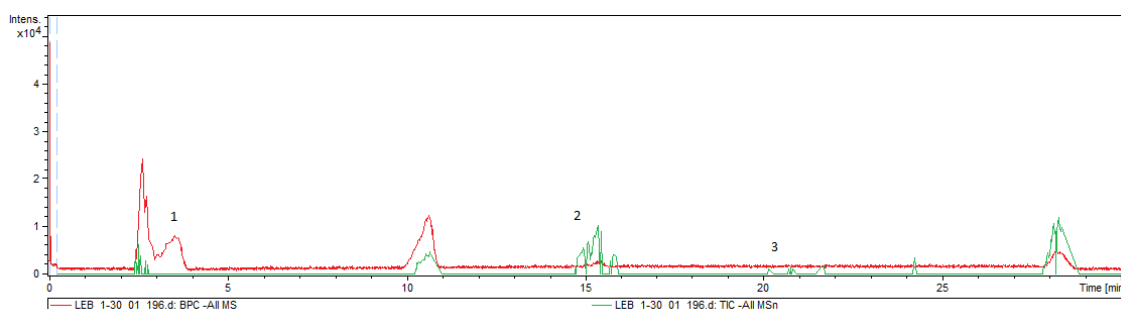


Figure S1: Total Ion Chromatogram (TIC – green line) and Base Peak Chromatogram (BPC – red line) of *Leandra australis*. 1: Gallic acid; 2: Rutin; 3: Quercetin.

5 CONCLUSÃO

O fracionamento líquido-líquido da espécie *Leandra australis* permitiu sugerir uma composição química com predominância de estruturas polares. Os doseamentos de metabólitos secundários identificaram maiores quantidades de moléculas fenólicas e taninos condensados nas amostras na planta, diferentemente, os flavonoides e alcaloides totais foram encontrados em menores quantidades. De forma complementar, a análise por CLAE permitiu identificar e quantificar o ácido gálico, quercetina e rutina no extrato bruto de *L. australis*.

A espécie em estudo apresentou considerável atividade antioxidante, principalmente na fração acetato de etila, a qual mostrou elevada atividade nas três metodologias empregadas. Esta atividade farmacológica obtida para a espécie *L. australis* foi justificada pelo alto teor de compostos fenólicos. Também foi possível observar que esta espécie vegetal age como antioxidante de formas diferentes e frente a diferentes tipos de radicais livres.

A espécie vegetal em estudo apresentou baixa citotoxicidade frente a *Artemia salina*, no entanto, na avaliação da genotoxicidade em células de radículas de *Allium cepa* foi verificada inibição do índice mitótico das células (atividade anti-proliferativa), a qual foi atribuída ao teor de taninos condensados e ao composto fenólico quercetina quantificado no extrato bruto da planta em considerável quantidade. Desta forma, foi verificada genotoxicidade no extrato bruto da espécie *L. australis*.

A toxicidade avaliada a partir de ratos *Wistar* mostrou que o extrato bruto de *L. australis* administrado em dose única e em doses repetidas por 28 dias não causaram mortalidade ou alterações comportamentais nos animais. Não houve alteração nos parâmetros hematológicos, porém a avaliação bioquímica da toxicidade aguda mostrou alterações nos níveis de Uréia, o que indica possível dano na função renal. A planta administrada de forma contínua pelos 28 dias mostrou que não houve nenhum tipo de toxicidade renal e hepática.

Sendo assim, estes resultados sugerem que a nefrotoxicidade identificada anteriormente está relacionada a administração aguda da espécie vegetal e a dose mais alta em relação as outras concentrações testadas na toxicidade de doses repetidas. No entanto, a ausência de sinais graves de toxicidade após a administração oral da planta é sugestiva de baixa toxicidade.

Este trabalho permitiu a obtenção de resultados mais detalhados sobre a composição química de *L. australis*, visto que, os doseamentos de metabólitos secundários e as quantificações em CLAE foram realizados pela primeira vez nesta espécie vegetal. Adicionalmente, este trabalho trouxe resultados inéditos sobre seu potencial antioxidante e toxicidade. Entretanto, ainda são necessários outros estudos os quais possam avaliar mais minuciosamente a composição química e as defesas antioxidantes do extrato. Também é importante a realização de estudos histopatológicos, a fim de confirmar o dano renal identificado na toxicidade aguda.

REFERÊNCIAS

- ALICE, C. B. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. Vol. 7. Editora da ULBRA, 1995, 208p.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- ARAÚJO, T. A. S. **Atividade antioxidante de plantas medicinais da Caatinga e Mata Atlântica: aspectos etnobotânicos e ecológicos**. 2012. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal De Pernambuco, Recife, 2012.
- ARCANJO, D. D. R. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.444-447, 2007.
- BAPTISTA, M. M. et al. Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in Southern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.9, n.54, p.1-16, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. D. Duas novas espécies de *Leandra* Raddi (Melastomataceae) para o Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 573-578, 2005.
- BEDNARCZUK, V.O et al. Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.
- BRASIL. Portaria SES 588 de 2017. Institui a Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul e listas complementares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Porto Alegre, RS, 2017. Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20171201/22110143-portaria-replame-rio-grande-do-sul.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2018.
- CAMARGO, A. E. et al. O gênero *Leandra*, seções *Carassanae*, *Chaetodon*, *Niangae*, *Oxymeris* e *Secundiflorae* (Melastomataceae) no estado do Paraná. **Rodriguésia**, v. 60, n. 3, p. 595-631, 2009.
- CAMARGO, A. E.; GOLDENBERG, R. O. *Leandra* seção *Leandraria* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. **IHERINGIA, Série Botânica**, v. 62, n. 2, p. 103-111, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CEOLIN, T. et al. Plantas medicinais utilizadas pelos agricultores ecológicos na região sul do Rio Grande do Sul. **Pelotas: Embrapa clima temperado**, p.1-70, 2011.

CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CLEMES, S. M.; ZENI, A. L. B.; KRETZSCHMAR, M. Avaliação química de folhas de plantas medicinais nativas utilizadas no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p. 10-12, 2008.

CREVELIN, E. J. et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827-830, 2006.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CUNHA, L. C et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p.357-362, 2013.

DRUMMOND, R. A. R.; ALVES, R. J. U.; KOSCHNITKE, C. Melastomataceae da Serra de São José, Minas Gerais. **Revista de Biologia Neotropical**, v.4, n.1, p.1-12, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, n. 8, p. 51-54, 2004.

GOLDENBERG, R.; SOUZA, C. M. F.; DEQUECH, H. B. *Clidemia*, *Ossaea* e *Pleiochiton* (Melastomataceae) no estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 453- 466, 2005.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.

JOFFRY, S. M. et al. *Melastoma malabathricum* (L.) Smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: A review. **Hindawi**

Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, p. 48, 2012.

LEITE, T. C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero *Marctia* (Melastomataceae)**. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2009.

MARTIN, C. V.; MICHELANGELI, F. A. Comparative seed morphology of *Leandra* (Miconieae, Melastomataceae). **Brittonia**, v. 61, n. 2, p. 175-188, 2009.

MESSIAS, M.C.T.B et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MOREIRA, L. A. O. **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. de extratos de duas espécies da família Melastomataceae**. 2013. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus de Anápolis, Anápolis, 2013.

Organization for economic corporation development (**OECD**). Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. 468 adopted by the council on 27th, july 1995.

Organization for economic corporation development (**OECD**). Guideline 423. Acute oral toxicity- acute toxic class method. 470 adopted by the council on 17th, December 2001.

OLIVEIRA, F. A. **Plantas Mediciniais: uma opção no cuidado em saúde**. 2014. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem), Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2014.

PEÑA M.H et al. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. 223p.

PEREIRA, R. J.; E CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERON, A. P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

PIRIZ, M. A. et al. Plantas medicinais no tratamento complementar do Diabetes mellitus. **Revista de Enfermagem**, v.5, n.7, p.1738-1743, 2011.

RATNAM, D. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release.**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RENNER, S. S. Revisions of Pterogastra and Schwackaea (Melastomataceae: Melastomeae). **Nord. J. Bot – Section of tropical taxonomy**, v. 14, n. 1, p. 65-71, 1994.

RODRIGUES, J. et al. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 120-126, 2008.

ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.1, p.19-24, 2002.

SANTANA, M. D. O et al. O poder das plantas medicinais: uma análise histórica e contemporânea sobre a fitoterapia na visão das idosas. **Multidebates**, v.2, n.2, p.10-27, 2018.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos naturais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^o Edição. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2010, 1104p.

TORRÃO, A. S. et al. Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, p.194-218, 2012.

VALADARES, M, C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

VANA, C, A. **Variabilidade genética em populações de uma espécie apomítica, *Leandra australis* (Cham.) Cogn., do estado do Paraná**. 2010. 29 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

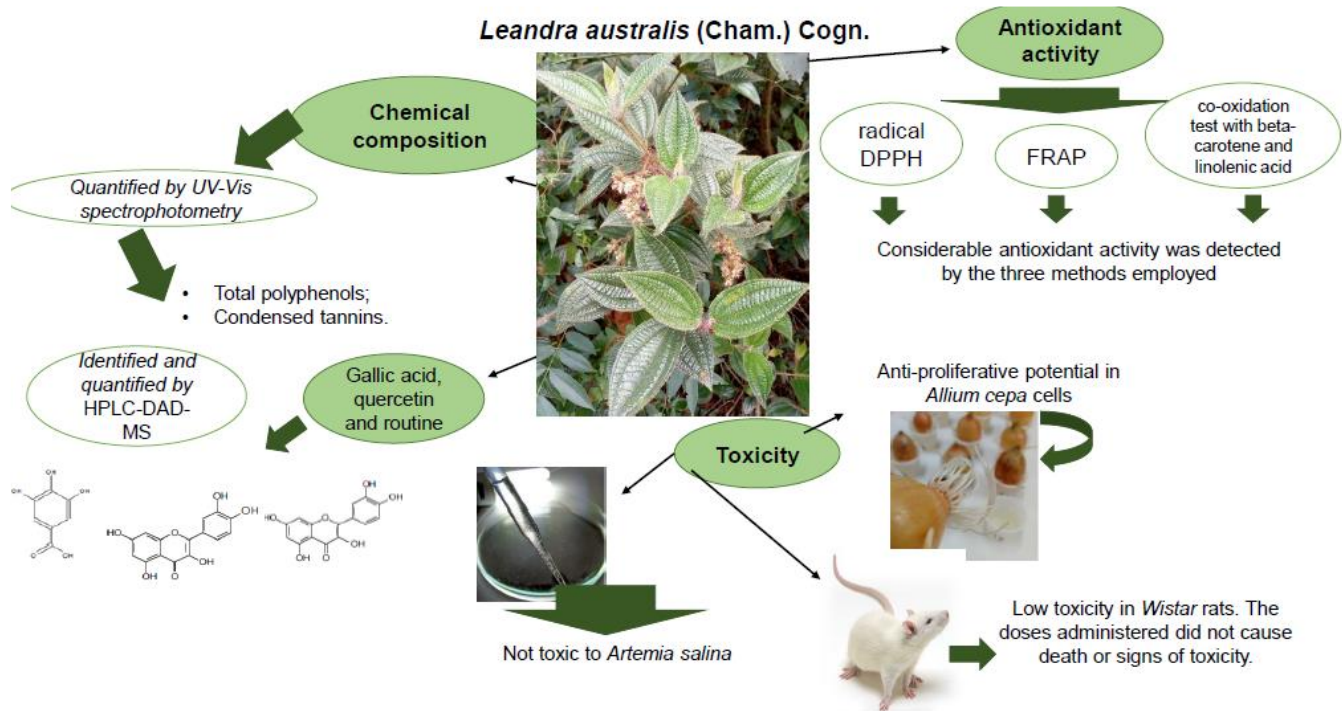
VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERRI, A.M; MOURA, A. A; MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista UNINGÁ Review**, v.30, n.1, p.55-61, 2017.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V (Org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. Ed. rev. e ampl. Itajaí, SC. Univali, 2014, 496 p.

ZAGO, L.M.S. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v.3, n.1, p. 157- 173, 2018.

APÊNDICE A – GRAPHICAL ABSTRACT



ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DE DOSES REPETIDAS (28 DIAS) DO EXTRATO DE *Leandra australis* EM RATOS Wistar", protocolada sob o CEUA nº 2204200419 (ID 002521), sob a responsabilidade de **Liliane de Freitas Bauermann e equipe; Thainara de Andrade Fortes; Camille Gaube Guex; Gabriela Buzatti Cassanego; Kassia Caroline Figueredo; Amanda Leitão Gindri** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 04/06/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ACUTE TOXICITY AND REPEATED DOSES (28 DAYS) OF *Leandra australis* EXTRACT IN RATS Wistar", utilizing 52 Heterogenics rats (20 males and 32 females), protocol number CEUA 2204200419 (ID 002521), under the responsibility of **Liliane de Freitas Bauermann and team; Thainara de Andrade Fortes; Camille Gaube Guex; Gabriela Buzatti Cassanego; Kassia Caroline Figueredo; Amanda Leitão Gindri** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/04/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2019](#) a [09/2020](#) Área: [Farmacologia](#)

Origem:	Biotério Central UFSM	sexo:	Machos	idade:	4 a 7 semanas	N:	20
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	100 a 200 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central UFSM	sexo:	Fêmeas	idade:	4 a 7 semanas	N:	32
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	80 a 160 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Experimental: prédio 21, sala 5229 - UFSM.

Santa Maria, 26 de julho de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Natural Product Research

Manuscript ID

GNPL-2021-1873

Title

Leandra australis: A potent antioxidant species with low toxicity that is composed of polyphenols

Authors

Fortes, Thainara

Pacheco, Patrícia

Silva, Lenise

Guex, Camille

Figueredo, Kássia

Engelmann, Ana

de Andrade, Cinthia

Gindri, Amanda

Bauermann, Liliane

Date Submitted

19-Aug-2021

Author Dashboard