

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIA NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, GENOTÓXICO
E FITOQUÍMICA DE *Richardia brasiliensis* GOMES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafaela Castro Dornelles

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, GENOTÓXICO E
FITOQUÍMICA DE *Richardia brasiliensis* GOMES**

Rafaela Castro Dornelles

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Área de Concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcelo Santos Oliveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, GENOTÓXICO E
FITOQUÍMICA DE *Richardia brasiliensis* GOMES

Elaborada por
Rafaela Castro Dornelles

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA


Melânia Palermo Manfron, Dr.
(Presidente/Orientador)


Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)


Viviane Dal-Souto Frescura, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 de Julho de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela família que me destes e pelas oportunidades.

Aos meus familiares, minha mãe Gisela Castro Dornelles, ao meu pai Cláudio Renato Paiva Dornelles, minha avó Shirley Garrido de Castro, minha irmã Letícia Castro Dornelles Severo, ao meu namorado Augusto Jardim de Oliveira, ao meu cunhado Ivo André Severo e meu sobrinho João Vitor Dornelles Severo por todo apoio, incentivo e compreensão nos momentos difíceis dessa caminhada e pelo amor incondicional.

A minha irmã Cristina Castro Dornelles (in memoriam), que onde quer que ela esteja, me dá forças para seguir a vida em frente.

As amigas Karen Portes e Bruna Rossi que me acolheram desde o início da Universidade Federal de Santa Maria, pela amizade e apoio em momentos precisos me fazendo rir nas horas de estresse e cobrando o término da dissertação.

A minha colega e amiga Vera Pereira Pagliarin que me recebeu de braços abertos, me ajudou e apoiou sempre, mimando com pãezinhos quentinhos de manhã.

As amigas Daniele Damian dos Santos, Ana Carla Decian, Rachel de Lima, Gabriela Camera Leal e Raquel Medina Necchi que conheci e convivi no laboratório, me ajudaram sem medir esforços e me apoiaram sempre.

Ao meu colega Ritiel Corrêa da Cruz que teve paciência de me ensinar muitas vezes a mesma coisa e mostrou-se um amigo.

Ao amigo e colega Gabriel Radiske que muito me “incomoda”, além disso deu o primeiro passo para trabalharmos com a poaia.

As eternas amigas de Alegrete Renata de David Perfeito, Letícia Hoffmann, Daiane Garcez, Luciana Pereira, Laura e Luiza Segabinazze por sempre estarem ao meu lado me apoiando, apesar da distância.

À professora Melânia Palermo Manfron, pelo incentivo, auxílio, orientação, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e por seu tempo disponibilizado.

Aos professores João Marcelo Oliveira e Solange Tedesco por sua dedicação, ensinamento e por disponibilizar seu tempo para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

Aos colegas do Labinfito pelo auxílio e paciência, principalmente nos momentos que eu não pude ajudar, pela companhia durante o mate, risadas, jantas e convivência no laboratório.

A Universidade Federal de Santa Maria pela cessão de todo o material necessários para o desenvolvimento do trabalho e infra-estrutura disponível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia e aos docentes por terem contribuído grandemente à minha vida profissional.

Aos colegas do mestrado que foram companheiros e de uma forma ou outra contribuíram para que esta etapa se concretizasse.

E aos demais que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse concluído.

O meu muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, GENOTÓXICO E FITOQUÍMICA DE *Richardia brasiliensis* GOMES

AUTORA: Rafaela Castro Dornelles

ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

Data e local da defesa: Santa Maria, UFSM, 13 de Julho de 2015

O uso de plantas medicinais na terapêutica desenvolveu-se ao longo dos anos concomitantemente à evolução da humanidade. Com a dificuldade de acesso aos medicamentos sintéticos, a rica biodiversidade vegetal e a situação sócio econômica desfavorável, a utilização de plantas medicinais é uma das principais formas de recurso terapêutico utilizada pela população. Estudos que reportem a ação das plantas medicinais aos organismos vivos, a padronização e a determinação da qualidade da droga vegetal são essenciais para a segurança e eficácia no uso destas. A espécie medicinal *Richardia brasiliensis* Gomes é conhecida como poaia branca e está inserida na família Rubiaceae, nativa da América do Sul e encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Devido a presença de metabólitos secundários como óleos voláteis, esteróis, alcaloides, taninos, cumarinas e flavonoides possui atividades farmacológicas consideráveis, destacando-se no tratamento de diabetes, hemorróidas, anti-helmíntico, antiemética e em doenças na pele. Esse trabalho objetivou determinar os parâmetros de qualidade da droga vegetal, identificar e dosar metabólitos secundários, realizar a histoquímica das folhas e caules e avaliar a capacidade antiproliferativa e genotóxica dos extratos e frações, em diferentes concentrações sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. O material vegetal de *R. brasiliensis* foi coletado no Campus da UFSM, nas diferentes estações do ano. O estabelecimento dos parâmetros de qualidade e a obtenção do extrato por maceração foram a partir do pó da droga vegetal. Na análise da droga vegetal foram determinados os teores de matéria estranha, porcentagem de água, índice de intumescência, cinzas totais e insolúveis em ácido, sinalizando que os valores encontrados estão de acordo com os valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira, embora os teores de cinzas tenham sido elevados quando comparados com outras espécies. O extrato de outono apresentou o maior rendimento (20,44%), e maior concentração de flavonoides (28,9 mg/g) quando quantificado por meio de espectrofotômetro. Rutina e ácido clorogênico foram identificados a partir da CLAE-DAD e a maior concentração de rutina (26,25 mg/g) foi no extrato de outono. Heterosídeos antociânicos, taninos, amino-grupos, esteróides e/ou triterpenos, alcaloides, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides foram reportados através das reações de caracterização. A partir da histoquímica das folhas e caules foram determinados lipídeos de reserva e estruturais, compostos fenólicos, antocianinas e alcaloides. A partir do teste de *Allium cepa* nas concentrações de 10 e 500 µg/mL e controles positivo, negativo e do diluente, foi determinado a capacidade antiproliferativa e genotóxica. O extrato bruto de outono e a fração butanólica na concentração de 500 µg/mL apresentaram os menores índices mitótico (5,42 e 6,75% respectivamente). Os extratos e frações apresentaram baixo número de células com alterações (células binucleadas, micronúcleo, cromossomos desorganizados, pontes e quebra cromossômicas) quando comparados com o controle positivo (glifosato 1%).

Palavras-chave: Poaia-branca. Controle de qualidade. Substâncias ativas. Histoquímica. Teste *Allium cepa*.

ABSTRACT

Master's
Agrobiology Graduate Program
Universidade Federal de Santa Maria

ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL, GENOTOXIC AND PHYTOCHEMISTRY OF *Richardia brasiliensis* GOMES

Author: Rafaela Castro Dornelles

Advisor: Melânia Palermo Manfron

Date and local presentation: Santa Maria, UFSM, July 13th, 2015

The use of medicinal plants in therapy has developed over the years concurrently with the humanity evolution. With the difficulty of access to synthetic drugs, the rich plant biodiversity and the adverse economic situation that represents an obstacle to the use of traditional drugs, make the use of medicinal plants one of the main forms of therapeutic resource used by the population. In this way, studies reporting the effects of medicinal plants in living organisms, the standardization and determination of plants's quality are essential for a safe and effective use of it. The medicinal plant *Richardia brasiliensis* Gomes is known as white ipecac and is inserted in the Rubiaceae family, native to South America and found in tropical and subtropical regions. Secondary metabolites, such as volatile oils, sterols, alkaloids, tannins, flavonoids and coumarins this plant has important pharmacological activities in the treatment of diabetes, hemorrhoids and skin disease. Also, it is reported as having anthelmintic and anti-emetic actions. This study aimed to determine the vegetable parameters of quality, identify and quantify secondary metabolites, analyze the histochemistry of leaves and stems and evaluate the antiproliferative and genotoxic capacity of extracts and fractions at different concentrations on the cell cycle of *Allium cepa* L. *R. brasiliensis* was collected on the UFSM campus, in different seasons. The establishment of quality parameters and the obtainment of the extract by maceration were made from the plant drug powder. The extraneous material, percentage of water, swelling index and total and acid insoluble ash were determined by analyzing the plant material. The results showed that our findings are in line with the values recommended by the Brazilian Pharmacopoeia, although the ash content have been high when compared to other species. The autumn extract had the highest yield (20.44%), and highest concentration of flavonoids (28.9 mg/g) as quantified by spectrophotometer. Rutin and chlorogenic acid were identified by HPLC-DAD and the highest concentration of rutin (26.25 mg/g) was in the autumn extract. Anthocyanin glycosides, tannins, amino groups, steroids and/or triterpenes, alkaloids, coumarins, organic acids and flavonoids have been reported through the characterization reactions. From the histochemistry of leaves and stems, it was determined the presence of storing and structural lipids, as well as phenolic compounds, anthocyanins and alkaloids. From the *Allium cepa* test concentrations of 10 and 500 µg/mL and positive, negative and diluent controls, it was possible to determine the genotoxicity and antiproliferative capacity of the plant. The crude extract of autumn and the butanol fraction at a concentration of 500 µg/mL had the lowest mitotic index (5.42 and 6.75% respectively). The extracts and fractions showed low number of altered cells (binucleated cells, micronucleus, disorganized chromosomes, chromosomes bridges and break) when compared to the positive control (glyphosate 1%).

Key words: Ipecac-white. Quality control. Active substances. Histochemistry. *Allium cepa* test.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

TABLE I - Physico-Chemical parameters of quality control <i>Richardia brasiliensis</i>	41
TABLE II - Dosing total polyphenols, flavonoids and tannins within the seasons.....	43
TABLE III - Phytochemical characterizing of <i>Richardia brasiliensis</i>	44
TABLE IV - Yield of the crude extract.....	45
TABLE V - Chlorogenic acid and rutin concentrations in <i>Richardia brasiliensis</i> , in crude extracts (CE) of the different seasons.....	48

MANUSCRITO 2

Tabela 1 - Grupo de compostos químicos identificados em <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes, reagentes cromáticos utilizados e órgão no qual foi identificado a substância ativa.	59
--	----

MANUSCRITO 3

Tabela 1 - Tratamentos com extratos e frações de <i>Richardia brasiliensis</i> , controles, número total de células observadas nas diferentes fases do ciclo celular e determinação do índice mitótico (IM) no teste de <i>Allium cepa</i>	86
Tabela 2 - Total de células observadas nas diferentes fases do ciclo celular com alterações cromossômicas (Ac).....	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Espécies pertencentes à família Rubiaceae, com reconhecida importância econômica. (A) *Coffea arabica* L.; (B) *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.; (C) *Cinchona officinalis* L..... 18
- Figura 2: *Richardia brasiliensis* Gomes com crescimento prostrado (A); caule sub-suculento (B); folhas opostas (C); flores hexâmeras e corola branca ou rosada (D) e inflorescências em glomérulos (E).
Fonte: <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/rubiacea/richardia-brasiliensis>..... 21
- Figura 3: Estrutura básica de um fenol..... 26
- Figura 4: Exemplo de produtos naturais ou fármacos derivados de plantas, utilizados na terapia do câncer..... 31
- Figura 5: *Allium cepa* em contato com a substância a ser testada..... 32

MANUSCRITO 1

- Figure 1: Chromatographic profile by HPLC-DAD, at a wavelength of 355 nm of chlorogenic acid standards (A) obtained in retention time of 16.5 min; rutin (B) with retention time of 28.6 min and quercetin (C), with retention time 36.5 min. 46
- Figure 2: Chromatographic profiles obtained by HPLC-DAD, where it is possible to observe the presence of chlorogenic acid (A) at a wavelength of 327 nm and rutin (B) with a wavelength of 355 nm, in the crude extract of *Richardia brasiliensis* G., obtained from plants collected in winter. 47

MANUSCRITO 2

- Figura 1 - Anatomia geral do caule (Fig. 1A a 1C) e folha (Fig. 1D a 1F) de *Richardia brasiliensis* Gomes. Cortes transversais, à mão livre. Fig. 1A Aspecto geral do caule, corado com azul de toluidina. Microscopia de campo claro. Fig. 1B Epiderme simples e presença de antocianinas na região externa do córtex, corado com azul de toluidina. Microscopia de campo claro. Fig. 1C Epiderme simples do caule, sem a presença de corante, evidenciado a presença de antocianinas. Microscopia de campo claro. Fig. 1D e 1E Seção transversal da lamina foliar, demonstrando a epiderme simples, mesofilo foliar e tricomas tectores. Sem a presença de corante. Microscopia de campo claro. Fig. 1F Seção transversal da lamina foliar, corado com azul de toluidina. Microscopia de campo claro. (ep) Epiderme simples. (co) Cortex. (sv) Sistema vascular. (me) Medula. (ed) Endoderme. (pp) Parênquima paliçádico. (pe) Parênquima esponjoso. (*) Tricoma tector. 72
- Figura 2 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 2A a 2C) e caule (Fig. 2D a 2I) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 2A Lipídios de reserva no mesofilo e lipídios estruturais na epiderme. Corado com sudan red 7B. Microscopia de campo claro. Fig. 2B e 2C presença de

lipídios de reserva, corados com sudan III. Microscopia de campo claro. Fig. 2D e 2E Presença de lipídios estruturais na porção cutinizada da epiderme e na endoderme, respectivamente, corados com sudan III. Microscopia de campo claro. Fig. 2F e 2H Detalhe dos lipídios estruturais na porção externa da epiderme e em toda a parede da endoderme, corados com sudan black B. Microscopia de campo claro. Fig. 2G, corado com sudan red 7B, demonstrando a presença de lipídios estruturais e de reserva na porção externa do córtex. Microscopia de campo claro. Fig. 2I Caracterizando a presença de lipídios estruturais nas estrias de Caspary, presente na endoderme. Corado com Vermelho Neutro. Microscopia de fluorescência. (ep) Epiderme simples. (ms) Mesofilo. (*) Tricoma tector. (pp) Parênquima paliçádico. (pe) Parênquima esponjoso. (le) Lipídio estrutural. (lr) Lipídio de reserva. (es) Estômato. (co) Cortex. (ed) Endoderme..... 74

Figura 3 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 3A a 3D) e caule (Fig. 3E a 3F) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 3A Presença de compostos fenólicos na epiderme da folha. Fig. 3B Detalhe da presença de compostos fenólicos na epiderme simples da folha. Figs. 3C e 3D Detalhe da presença de substâncias fenólicas nos tricomas e células do pedestal. Fig. 3E Compostos fenólicos nas células da epiderme do caule. Fig. 3F Presença de compostos fenólicos nas paredes tangenciais internas da endoderme. Cortes corados com dicromato de potássio, observados em microscopia de campo claro. (ep) Epiderme simples. (ms) Mesofilo. (cf) Compostos fenólicos. (cp) Células do pedestal. (*) Tricoma tector. (ed) Endoderme. (co) Córtex. (me) Medula..... 76

Figura 4 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 4A, 4C e 4D) e caule (4B, 4E a 4F) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 4A Corte histológico da folha submetido ao contato com solução alcalina de NaOH, apresentando substâncias amareladas e laranjas, vista sob microscopia de campo claro combinado com fluorescência. Fig. 4B Presença de antocianinas na epiderme do caule, sem a utilização de corante. Microscopia de campo claro. Fig. 4C e 4D Cortes submetidos a solução de NaOH mostrando detalhes da presença de substâncias amarelas na epiderme e em células do mesofilo, observadas em microscopia de fluorescência. Fig. 4E Corte histológico do caule, observado em campo claro, submetido ao contato com NaOH, com a presença de substâncias amarelas. Fig. 4F Corte de caule, submetido ao contato com solução de KOH, apresentando substâncias amarelas no córtex, endoderme e região medular, observado em microscopia de fluorescência. (an) Antocianinas. (*) Substâncias amarelas fluorescentes. (co) Córtex. (me) Medula. (ed) Endoderme..... 78

Figura 5 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 5B a 5D) e caule (Fig. 5A, 5E e 5F) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 5A Presença de substâncias alcaloídicas no periciclo do caule. Fig. 5B Alcaloides no periciclo da folha. Fig. 5C e 5D Detalhe da presença de alcaloides na região externa do córtex da folha. Fig. 5E Presença de alcaloides na região medular do caule. Fig. 5F Presença de alcaloides na região do córtex do caule. Cortes corados com reagente de Wagner, observados em microscopia de campo claro. (pc) Periciclo. (al) Alcaloides. (ep) Epiderme simples. (co) Córtex. (me) Medula. 80

MANUSCRITO 3

Figura 1 - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos com extratos e frações de *Richardia brasiliensis*. A) Células normais em interfase e prófase (seta preta longa); B) Célula normal em metáfase (seta preta curta) e

telófase (seta preta curta com preenchimento); C) Célula normal em metáfase; D) Célula normal em anáfase (seta preta longa sem preenchimento). Aumento de 40 X. Escala 10 μm 90

Figura 2 - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos com extratos e frações de *Richardia brasiliensis*. A) Célula binucleada; B) Célula com micronúcleo (seta longa preta); C) Prófase desorganizada (seta curta preta); D) Quebra cromossômica (seta curta sem preenchimento) em metáfase; E) Ponte anafásicas; F) Quebra cromossômica na telófase. Aumento de 40X. Escala 10 μm 91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

μg – Micrograma

μm – Micrômetro

2n – Número diploide de cromossomos

Ac – Alterações cromossômicas

Acetil CoA – Acetilcoenzima A

AG – Agosto

AlCl_3 - Cloreto de alumínio

AP – Abril

B – Células binucleadas

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CE – Extrato bruto

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm – centímetro

D – Células desorganizadas

DMSO – Dimetilsulfóxido

EA – Extrato aquoso

EH – Extrato hidroetanólico

Fe^{3+} - Ferro III

FeCl_3 - Cloreto férrico

Fração ACoET - Fração Acetato de etila

Fração BUT - Fração butanólica

Fração CLOR – Fração clorofórmica

Fração HEX - Fração hexânica

g – Grama

H_2O – Água

HCl – Ácido clorídrico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC – DAD – Performance Liquid Chromatography-Diode Array detector

IM – Índice mitótico

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
IPCS - Programa Internacional de Segurança Química
JA – Janeiro
KOH – Hidróxido de potássio
 $K_2Cr_2O_7$ – Dicromato de potássio
M - Micronucleo
m/m – massa/massa
MeOH – Alcool metílico
mg – Miligrama
min – Minutos
mL – Mililitro
mm – Milímetro
N – Normal
NaOH – Hidróxido de sódio
nm – Nanômetro
°C – Graus Celsius
OC – Outubro
OH – Hidroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
P – Ponte cromossômica
Q – Quebra cromossômica
Rf – Fator de retenção
SMART – Teste de mutação e combinação somática
SMDB – Herbário do Departamento de Biologia
T – Tratamentos
UFES – Universidade Federal de Santa Maria
UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas
UV – Ultravioleta
WHO – World Health Organization
 x^2 – Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	134
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Família Rubiaceae.....	17
2.2. A espécie <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	19
2.3. Parâmetros do controle de qualidade do material vegetal	22
2.4. Metabolismo secundário e aspectos farmacológicos	25
2.5. Testes histoquímicos.....	28
2.6. Ciclo celular, atividade antiproliferativa e genotóxica	29
Seasonal background of the physico-chemical quality control parameters and phytochemical profile of <i>Richardia brasiliensis</i> GOMES	35
ABSTRACT	35
INTRODUCTION.....	36
MATERIALS AND METHODOLOGY	37
RESULTS AND DISCUSSING	40
CONCLUSIONS.....	48
ACKNOWLEDGEMENTS	49
REFERENCES.....	49
Análise histoquímica de folhas e caules de <i>Richardia brasiliensis</i> GOMES (Rubiaceae)	54
RESUMO	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAIS E MÉTODOS	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS	65
Potencial Antiproliferativo e Genotóxico dos Extratos e Frações de <i>Richardia brasiliensis</i> GOMES pelo sistema Teste de <i>Allium cepa</i>	81
RESUMO	81
INTRODUÇÃO	82
MATERIAIS E MÉTODOS	84
RESULTADOS	85
DISCUSSÃO.....	89
CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	95
3. DISCUSSÃO GERAL	99
4. CONCLUSÕES.....	1011
5. REFERÊNCIAS	1022

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Esse conhecimento é baseado em descobertas casuais, através da observação das interações do ambiente onde as populações vivem (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; DELMONDES et al., 2013) ou seja, o desenvolvimento da medicina tradicional, foi construída ao longo dos séculos, empiricamente.

A utilização de material vegetal como terapêutico pela humanidade ocorreu antes mesmo da estória escrita. Os primeiros relatos arqueológicos da utilização de plantas medicinais ocorreram 60.000 a.C. em rituais de sepultamentos, já em 11.000 a.C. há relatos da utilização de espécies com substâncias psicoativas (ROCHA et al., 2015).

Os mais diversos povos incluíam a utilização da flora local em seu dia-a-dia, seja na forma de alimento, remédios, roupas e abrigo. Muitas das plantas eram intrigantes devido ao seu poder mágico, utilizados por feiticeiros e em cultos religiosos (SCHIPPER, 1999).

Um dos mais importantes relatos já escritos ocorreu no Antigo Egito em 2.600 a.C. na qual populações da região Mesopotâmica utilizavam vegetais para a cura e tratamento de doenças (YUNES; CALIXTO, 2001). O Papiro de Ébers é um dos principais e primeiro texto médico que se conhece com a descrição sobre plantas medicinais relatadas pelo homem. Continha cerca de 800 receitas e mais de 700 drogas de natureza animal, vegetal e mineral, utilizados na forma de decocções e infusões (SCHIPPER, 1999; VILELA, 1997 apud ARGENTA et al., 2011).

A utilização e o conhecimento sobre as plantas medicinais, muitas vezes é o único recurso terapêutico de uma comunidade (MACIEL et al., 2002), sendo que uma grande parcela da população brasileira e mais de 2/3 da população mundial utilizam esse recurso. A situação sócio econômica, o fácil acesso aos recursos vegetais e o alto custo dos medicamentos sintéticos são fatores que influenciam a aceitação de plantas como medicina alternativa (ARGENTA et al., 2011).

Apesar da larga utilização, muito pouco se conhece sobre o real efeito das drogas vegetais nos organismos vivos, sendo que menos de 1% foi estudada adequadamente. Segundo Fonseca (2012) o número de informações sobre espécies medicinais nos últimos 20 anos tem crescido apenas 8% ao ano.

As pesquisas com plantas medicinais tentam resgatar o conhecimento popular e combinar as informações adquiridas nas comunidades que as utilizam, corroborando através

de estudos científicos a finalidade terapêutica da espécie. Junior, Pinto e Maciel (2005), alertam para o fato de que no Brasil, espécies vegetais são consumidas com quase nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas inclusive, sendo empregadas para fins medicinais diferentes do que se é conhecido e indicado popularmente.

Além do reduzido conhecimento sobre plantas medicinais, sua efetiva atuação e toxicidade nos organismos vivos, as pesquisas com drogas vegetais ganham forte embasamento pelo fato de o país possuir uma rica diversidade biológica, possuindo uma variedade de ambientes com características específicas influenciando em uma grande diversidade de espécies vegetais.

A ação terapêutica de uma planta medicinal deve-se a presença de substâncias ou princípios ativos, que são compostos resultantes do metabolismo secundário vegetal, e possuem uma diversidade de funções, principalmente na proteção das espécies produtoras (TAIZ; ZEIGUER, 2013).

Para o homem, os produtos naturais exercem um papel importante ao longo dos anos, na descoberta de fármacos, contribuindo com seu uso *in natura* ou mesmo como ponto de partida para a obtenção de novas moléculas (NIERO, 2010). Sabe-se que até o ano de 2002, 28% dos medicamentos disponibilizados no mercado, possuíam princípios ativos isolados de produtos naturais ou foram sintetizados a partir destes (BRANDÃO et al., 2010).

Muitas espécies vegetais, tem sua utilização bastante difundida, sendo as vezes utilizados como a principal substância no tratamento de uma doença específica, como por exemplo, os alcaloides vimblastina e vincristina, extraídos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, utilizado no tratamento do linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010); ou ainda *Cinchona pubescens* Vahl, uma Rubiaceae da qual é extraído o alcaloide quinina, um potente antimalárico e a quinidina que reduz os batimentos cardíacos (SILVA; ARAGÃO, 2009).

A espécie medicinal *Richardia brasiliensis* Gomes, pertence à família Rubiaceae e é conhecida popularmente como poaia branca. Esta espécie é nativa da América do Sul, sendo encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil possui ampla distribuição, principalmente em regiões de intensa atividade agrícola (ROSSETO; PITELLI; PITELLI, 1997; LORENZI, 2008; SCHOTT; CANTO-DOROW, 2011).

Poaia branca tem sido relatada no tratamento de diabetes, hemorróidas, como anti-helmintico, antiemética, em doenças na pele (eczemas e queimaduras), entre outros (PINTO, 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009).

Na espécie foram identificados e isolados flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, compostos fenolicos, cumarinas e ácidos orgânicos (PINTO 2008; FIGUEIREDO et al., 2009, 2010; SOUZA, 2009), substâncias com características terapêuticas que podem corroborar com seu uso medicinal.

Com base nos dados já descritos para a espécie, essa pesquisa teve como objetivo identificar e comparar metabólitos secundários em *R. brasiliensis* coletada nas quatro estações do ano, determinar parâmetros de controle de qualidade para a droga vegetal, analisar histoquimicamente e avaliar o potencial antiproliferativo e genotóxico nos extratos e frações, sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Rubiaceae

No século XIX começaram os primeiros estudos sobre a classificação da família Rubiaceae, quando Carolus Linnaeus (1753 *apud* PEREIRA, 2007) fez uma classificação bastante genérica, englobando todo o reino vegetal. Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, descreveu pela primeira vez a família Rubiaceae *Juss.* O nome da família foi derivado do gênero *Rubia* L., do latim *rubium*, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes das plantas deste gênero (CRONQUIST, 1981).

Segundo Delprete, Smith e Klein (2004) Rubiáceas foram classicamente reconhecidas como uma família monofilética, sendo confirmado por estudos filogenéticos baseados em dados moleculares. Entretanto, desde sua descrição original a família Rubiaceae tem passado por algumas mudanças quanto à descrição taxonômica. Estudos moleculares atuais indicam que o grupo é classificado em três subfamílias: Rubioideae, Ixoroidea e Cinchonoideae (DELPRETE, SMITH, KLEIN, 2004) e em mais de 43 tribos, que não estão bem estabelecidas até o momento (BORHIDI, 2012).

Os representantes dessa família são cosmopolitas e a distribuição ocorre nas mais diversas formações vegetacionais, destacando-se como um importante elemento em quase todos os tipos de ambientes, aparecendo entre as espécies mais abundantes no sub-bosque de florestas neotropicais e apresentando importante papel na composição da vegetação de regiões quentes (SOUZA; LORENZI, 2005; PEREIRA; CARVALHO-OKANO; GARCIA, 2006; MIATELO, 2008).

As plantas da família Rubiaceae reúnem representantes de hábitos diversificados, desde árvores, arbustos, ervas eretas ou reptantes, trepadeiras, às vezes epífitas, herbáceas ou lenhosas até algumas lianas (DELPRETE; SMITH; KLEIN, 2004; PEREIRA, 2007; BORHIDI, 2012).

São conhecidas cerca de 12.000 a 13.000 espécies e 650 gêneros, distribuídos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas frias (DELPRETE, 2004; DELPRETE; JARDIM, 2012; MENDONÇA et al., 2015). No Brasil, Delprete (1998), estima ser encontrado aproximadamente 1.600 espécies, podendo chegar à 2.000, distribuídas em 115 gêneros.

A família é caracterizada principalmente por apresentar plantas com estípulas interpeciolares (entre os pecíolos) e intrapeciolares (entre o pecíolo e o talo); folhas opostas ou verticiladas, raramente alternas com margens inteiras; flores bissexuais ou unissexuais e flores monoclamídeas; corola gamopétala; ovário usualmente ínfero, porém raras vezes súpero ou semisúpero, com mais de um lóculo (BORHIDI, 2012; SOUZA; LORENZI, 2012).

De acordo com Souza, Cislinski e Romagnolo (1997), Rubiaceae tem sido relacionada, pela sua riqueza florística dentre as quatro principais famílias de angiospermas, além disso, possui o maior número de espécies dentro da ordem Gentianales, com cerca de 70% do total (DELPRETE; JARDIM, 2012).

Possuem reconhecida importância econômica, sendo explorada como alimentícias como *Coffea arabica* L. (Fig. 1A) que fornece uma bebida mundialmente conhecida; ornamental como espécies dos gêneros *Ixora* L., *Hamelia* Jacq., *Manettia* Boehm., utilizadas em parques e jardins; medicinal, como no caso de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. (Fig. 1B) espécie de onde se extrai a emetina e a cefalina, estimulantes do sistema nervoso central e periférico e *Cinchona officinalis* L. (Fig. 1C) de onde se extrai diversos alcaloides, como a quinina (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006; PAIVA; FILHO; MOURA, 2009; NETO; PEIXOTO, 2012).

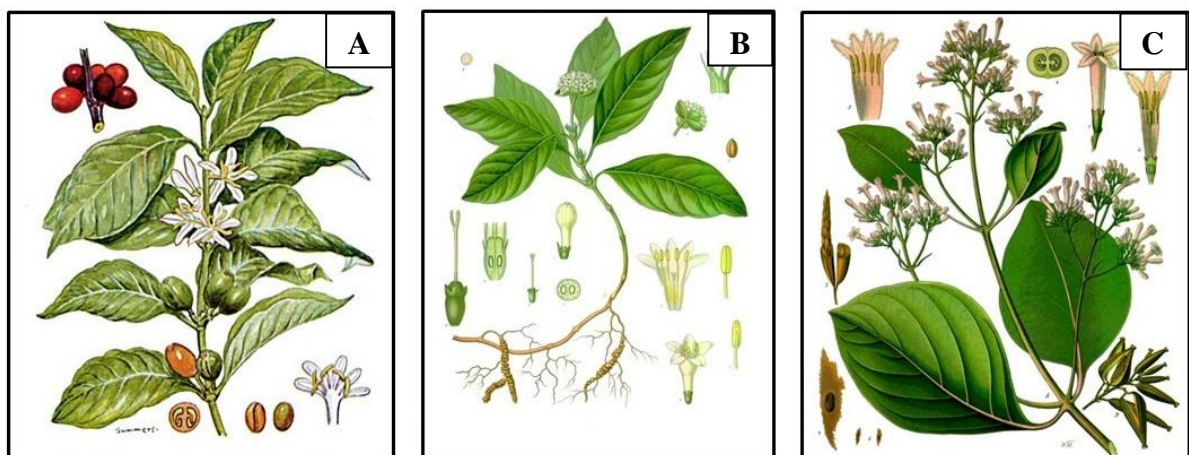


Figura 1: Espécies pertencentes à família Rubiaceae, com reconhecida importância econômica. (A) *Coffea arabica* L.; (B) *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.; (C) *Cinchona officinalis* L.

Fontes: http://www.coffee4dummies.com/articles/coffee_species

<https://projectmateriamedica.wordpress.com/2014/07/31/cephaelis-ipecacuanha>

<http://imgarcade.com/1/cinchona-officinalis-plant>

As espécies de Rubiaceae apresentam grande plasticidade quanto a sua composição química, apresentando uma variedade de compostos como flavonoides, iridoides, alcaloides, especialmente alcaloides indólicos, antraquinonas, alguns derivados fenólicos, taninos, triterpenos e diterpenos e menos frequentemente, saponinas (BOLZANI et al., 2001; SOUZA; MENDONÇA; SILVA, 2013).

Várias espécies pertencentes à família são estudadas com finalidades farmacológicas, além de serem utilizadas na medicina popular. Em estudos realizados por Souza, Mendonça e Silva (2013), das 102 espécies de Rubiaceae que foram inventariadas em estudos etnobotânicos, 40 são empregadas como medicinal. Algumas espécies já possuem ação comprovada, destacando-se plantas do gênero *Psychotria* L., do qual são extraídos alcaloides indólicos utilizados como fortes analgésicos (MOURA; MARUO, 2014); gênero *Guettarda* L. utilizadas no tratamento de tifo, febres, diarreias, como anti-inflamatória e antiespasmódica (LIMA et al., 2009) e espécies de *Uncaria* sp. Schreb. com ação anti-inflamatória, antioxidante e principalmente imunestimulante (VALENTE et al., 2006); entre outras.

Dentre os membros pertencentes a família Rubiaceae algumas espécies do gênero *Richardia* L. são utilizadas no tratamento de doenças, com destaque para as espécies *R. grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. e *R. brasiliensis* Gomes (PINTO, 2008; PINTO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009, 2010; SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2009; MORAIS et al., 2013)

São conhecidas 15 espécies de *Richardia*, nativas da América tropical, aparecendo desde o México, sudeste dos Estados Unidos até o Sul do Brasil e centro da Argentina. No Rio Grande do Sul, são encontradas 4 espécies: *R. humistrata*, *R. stellaris*, *R. brasiliensis* e *R. grandiflora*, conhecidas por poaia, classificadas a partir de flores tetrâmeras ou hexâmeras e ovário tetralocular ou trilocular (LEWIS; OLIVER, 1974; DELPRETE; SMITH; KLEIN, 2005).

2.2. A espécie *Richardia brasiliensis* Gomes

A espécie *Richardia brasiliensis* Gomes pertencente à ordem Gentianales, família Rubiaceae, subfamília Rubioideae, tribo Spermacoceae, gênero *Richardia* (PORTO et al., 1977; DELPRETE; SMITH; KLEIN, 2004, 2005; LORENZI, 2008). É uma espécie de

hábitos herbáceos, anual ou perene, prostrada, ramificada, de caule viloso, conhecida popularmente por poaia, poaia-branca, poaia-do-campo, ervaço, ipeca e ipecacuanha (LORENZI, 2008). Apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde a Cordilheira dos Andes até a Costa Atlântica. A espécie é nativa da América do Sul e ocorre de forma descontínua em todos os estados brasileiros, principalmente em regiões com intensa atividade agrícola, como as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (DELPRETE; SMITH; KLEIN, 2005; FIGUEIREDO et al., 2009).

De acordo com Porto et al. (1977), Delprete, Smith e Klein (2005) e Lorenzi (2008), as características que definem a espécie são a presença de um caule sub-suculento, com aproximadamente 40 a 60 cm de comprimento, densamente hirsuto-pubescente, cilíndrico a tetragônico e entrenós compridos (4 a 6 cm); bainha estipular curta; folhas opostas, subsésseis, membranáceas a cartáceas, com pubescências em ambas as faces, ápice e base agudos, com aproximado 1,2 a 6 cm de comprimento por 0,5 a 2,5 cm de largura. As inflorescências encontram-se em glomérulos, rodeados por 2, 4 ou 6 brácteas foliáceas. As flores são geralmente hexâmeras, porém às vezes podem ser tetrâmeras ou pentâmeras. As sépalas normalmente encontram-se em número de 6. A corola é branca ou rosada, com um anel de pelos em sua face interna (Figura 2). Os estames encontram-se em número de 6, exsertos e o ovário é ínfero, trilocular, com um óvulo por lóculo. O fruto é do tipo esquizocarpo, separando-se em 3 mericarpos achatados na face ventral carinada e face dorsal convexa, coberta por pêlos hirtos.

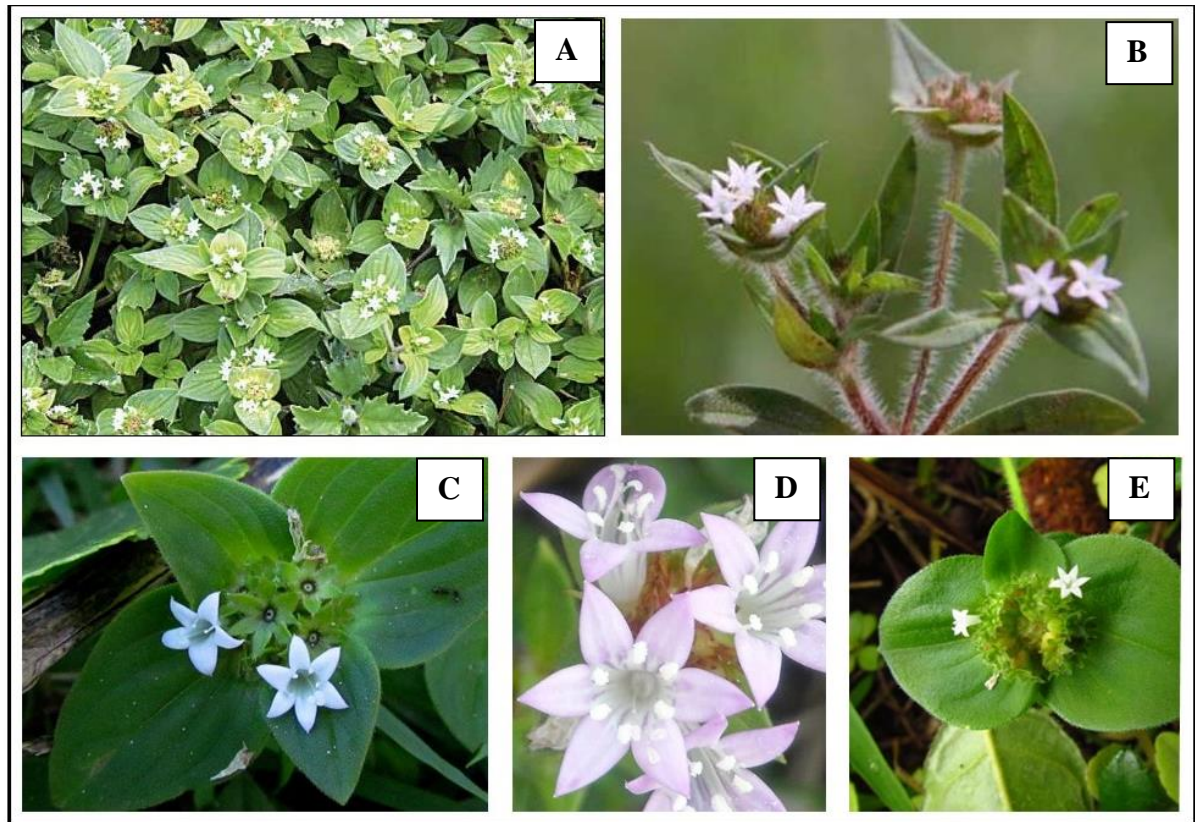


Figura 2: *Richardia brasiliensis* Gomes com crescimento prostrado (A); caule sub-suculento (B); folhas opostas (C); flores hexâmeras e corola branca ou rosada (D) e inflorescências em glomérulos (E).
 Fonte: <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/rubiaceae/richardia-brasiliensis>

A reprodução de *R. brasiliensis* ocorre através de sementes que germinam na primavera e encerram seu ciclo no verão (KISSMANN; GROTH, 2000), e no inverno entra em repouso. Segundo Lorenzi (1991), esta planta é mais comum em solos com boa umidade, porém não encharcados e seu desenvolvimento depende de uma boa iluminação e de regiões com vegetação menos densa. Já Porto et al. (1977) e Groth (1980), afirmam que a espécie prefere vegetar sobre solos pobres, secos ou pouco úmidos, argilosos e arenosos, ocorrendo na beira das estradas e em terrenos baldios.

Em estudo realizado por Perboni et al. (2010), foi evidenciado que a germinação de *R. brasiliensis* é aumentada quando as sementes são germinadas a temperatura de 25°C e na presença de luz e, inibida quando há a ausência desta, demonstrando que as sementes de poaia necessitam de luz para iniciar o processo de germinação, evidenciando um fotoblastismo positivo da espécie.

Por ser uma espécie de ciclo anual e ter facilidade em se adaptar aos diferentes sistemas de plantio (direto e convencional) é considerada uma planta daninha, a qual é infestante em culturas anuais ou perenes (ROSSETO; PITELLI; PITELLI, 1997). Pedrinho-Júnior; Bianco e Pitelli (2004) citam que o sucesso de uma planta infestante, está no fato de produzir e dispersar sementes ao longo do ciclo de desenvolvimento e espécies quando domesticadas, como a soja, perdem essa capacidade de dispersar suas sementes. Além disso, a espécie *R. brasiliensis* tem a capacidade de incrementar inicialmente a alocação de biomassa para o sistema radicular, o que provavelmente melhora a fixação da planta e o contato com os nutrientes do solo.

Apesar de ser reconhecida principalmente por infestar regiões agrícolas e competir por espaços e recursos nutricionais com diversas culturas, aos poucos, *R. brasiliensis*, vem ganhando espaço nas pesquisas com fins farmacológicos. Alguns grupos de pesquisas da região Nordeste e Centro-Oeste do país (PINTO, 2008; PINTO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009, 2010; SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2009; MORAIS et al., 2013) já vem a alguns anos demonstrando a presença de substâncias ativas com interesse terapêutico. Pinto et al. (2008) e Souza et al. (2009), mencionam sua utilização na medicina popular, como antiemética, antidiabética, anti-hemorroidal e vermífuga, e as frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica) obtidas à partir do extrato bruto possuem atividade antimicrobiana frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.3. Parâmetros do controle de qualidade do material vegetal

Com o crescimento da utilização de plantas medicinais no mundo, nas mais diversas comunidades, principalmente em países em desenvolvimento, tornou-se necessário um criterioso controle dos parâmetros de qualidade do material vegetal a ser utilizado pela população para o tratamento das mais diversas enfermidades (GIL, 2010). Além disso, a comercialização de insumos farmacêuticos derivados das plantas (extratos e material *in natura*), fitoterápicos ou mesmo fármacos sintetizados a partir de vegetais, estão em expansão e movimentando um montante bastante considerável no mercado mundial.

O controle de qualidade tem por objetivo padronizar através de testes ou métodos de ensaio, o material vegetal em uso, definindo critérios de identidade botânica, pureza do

material, uniformidade e caracterização dos constituintes químicos da espécie (MELO, 2007; MICHELIN et al., 2010; FARMACOPEIA, 2010; GIL, 2010). Esses parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos, são estabelecidos em Farmacopeias e Códigos Oficiais, como por exemplo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (FARIAS, 2007).

Os métodos farmacognósticos indicados na Farmacopeia Brasileira (2010) referem-se primeiramente a exames visuais, a fim de determinar características organolépticas, como cor, textura e odor. Incluem-se ainda caracterizações farmacobotânicas, através de análises macro e microscópicas, que permitem verificar indícios de contaminação e deterioração do material (OMS, 1998; GIL, 2010).

São ainda, realizadas reações de caracterização química dos constituintes, que permitem a identificação de grupos químicos como flavonoides, alcaloides, esteroides, entre outros, através de reações simples e de baixo custo, sendo geralmente inespecíficas, comuns a várias substâncias ou específicas ocorrendo somente com algumas estruturas típicas de uma única classe (FARIAS, 2007).

No controle físico-químico de qualidade, são realizados ensaios de pureza, através de processos que verificam a presença de material estranho à droga, como qualquer parte da planta medicinal que não o farmacógeno utilizado, partes de outras espécies, resíduos de natureza mineral, como terra, areia e pedras e ainda a presença de fragmento de insetos e fungos (MOUCO; BERNARDINO; CORNÉLIO, 2003; GIL, 2010).

Dentre os métodos de avaliação preconizados o conteúdo de cinzas determina a porcentagem de compostos inorgânicos em uma amostra vegetal (GIL, 2010), fornecendo a quantidade de material que permanece aderido à droga, após a incineração, determinando a presença de “cinzas fisiológicas”, que são derivadas do próprio tecido da planta e cinzas “não fisiológicas”, que são resíduos de impurezas que aderem à superfície da planta como areia e solo (OMS, 1998). Três diferentes métodos são utilizados para essas determinações: cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e cinzas sulfatadas (OMS, 1998; FARMACOPEIA 2010).

A determinação de água na droga vegetal é determinada a partir do teor de umidade, pois o excesso de água durante seu armazenamento favorece o desenvolvimento de microrganismos e a deterioração do material (GIL, 2010). A 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010), não determina quais teores são aceitáveis, porém a Farmacopeia Brasileira de 1998, preconizava valores entre 8 a 14% (m/m). Essa análise pode ser realizada pelo método gravimétrico, por dessecação; azeotrópico por destilação com um solvente imiscível ou volumétrico que se baseia na reação estequiométrica da água livre presente na amostra (FARMACOPEIA 2010; GIL, 2010).

O intumescimento da droga vegetal está relacionado à presença de gomas, mucilagens, pectina, hemicelulose e avalia o aumento do volume do material vegetal em contato com a água (GIL, 2010).

Além desses parâmetros são realizadas pesquisas de constituintes químicos indesejáveis, contaminantes microbiológicos, agrotóxicos, pesticida e metais pesados (FARIAS, 2007; FARMACOPEIA 2010; GIL, 2010).

Segundo Beek et al. (2009), um meio de controle de qualidade de produtos vegetais é determinar a composição química, através do perfil cromatográfico, verificando qualitativamente e quantitativamente a presença de determinado metabólito. O perfil cromatográfico pode ser obtido por diferentes técnicas cromatográficas como Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), dentre outras (FARIAS, 2007; GIL, 2010).

A determinação dos parâmetros de controle de qualidade de uma droga vegetal é um primeiro passo importante para o estudo, já que grande parte das espécies medicinais utilizadas popularmente, ainda não estão descritas na Farmacopeia Brasileira.

Vários grupos de pesquisas caracterizaram o material vegetal, tinturas e extratos de plantas medicinais. Nas raízes da espécie *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., usada como laxativa, foi realizado o controle de qualidade físico-químico e microbiológico (MICHELIN et al., 2010); tinturas e extratos secos de diversas espécies do cerrado foram caracterizadas por cromatografia, por Alves et al. (2011); *Bauhinia forficata* Link foi submetida ao controle de qualidade, desde análises microscópicas da droga rasurada à CLAE dos extratos e frações obtidos a partir de produtos comercializados na forma de chás, utilizados como hipoglicemiante (ENGEL et al., 2008); caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., uma Rubiaceae utilizada como diurética e hipotensora (ALVES et al., 2004).

Em *R. brasiliensis* (FIGUEIREDO et al., 2010), o teor de umidade das partes aéreas foi de 11,3% e 10,3% para as raízes, 14,05% e 7,85% de cinzas totais nas partes aéreas e raízes, respectivamente e 1,84% de cinzas insolúveis nas partes aéreas e 0,6% nas raízes, determinando parâmetros de pureza em material botânico pulverizado.

Os parâmetros de qualidade são propostos e determinados com embasamentos científicos e servem como apoio regulatório para posterior estudo e comercialização de uma droga que pode vir a tornar-se um fitoterápico. A caracterização resultará em especificações ou uma lista de testes e referências para procedimentos analíticos (COUTO; VITORINO; SILVA, 2010).

2.4. Metabolismo secundário e aspectos farmacológicos

O conjunto de reações químicas capazes de sintetizar substâncias complexas, a partir de compostos simples ou degradar essas substâncias, denomina-se metabolismo (GARCÍA; CARRIL, 2009). Nas plantas o metabolismo depende de sua fisiologia e é dividido em metabolismo primário e secundário.

O metabolismo primário é o conjunto de reações essenciais para o funcionamento e sobrevivência dos organismos, sendo responsável pelo desenvolvimento e manutenção celular. Possui caráter conservativo e universal e estão incluídas macromoléculas como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos (PROBST, 2012). As reações bioquímicas não ocorrem independentemente em um mesmo organismo, sendo que alterações no metabolismo primário podem afetar o metabolismo secundário (SANTOS, 2007), já que este segue rotas metabólicas que conduzem à formação dos compostos secundários (MASA, 2011).

Os produtos secundários ou produtos naturais diferentemente dos metabólitos primários que são encontrados em todo o reino vegetal, possuem produção, distribuição e acumulação restritas a um número limitado de organismos com bioquímica e metabolismo específico e único (SANTOS, 2007; TAIZ; ZEIGUER, 2013). Devido a vários fatores externos como alterações climáticas, condições de pH, nutrientes, disponibilidade de água no solo, presença ou ausência de predadores naturais entre outros fatores, o metabolismo secundário possui uma grande quantidade de estruturas, funções e aplicabilidades variadas (CANELHAS, 2012).

Algumas das funções das substâncias ativas provenientes do metabolismo secundário, nas plantas são agir contra predadores, insetos e animais herbívoros, em situações de estresse biótico e abiótico (raios UV, alterações ambientais), frente a microrganismos patogênicos, funções ecológicas específicas, na atração de polinizadores e, atuando como agentes alelopáticos (ALVES, 2001; GARCÍA; CARRIL, 2009; TAIZ; ZEIGUER, 2013). Embora não essenciais para o organismo produtor, essas funções conferem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie (SANTOS, 2007).

De acordo com a classificação proposta por Taiz e Zeiguer (2013) os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais, os terpenos ou terpenoides, ao qual estão incluídos os esteróis, os óleos essenciais, os cardenolídeos e as saponinas; os compostos

fenólicos que englobam flavonoides, cumarinas, taninos e ligninas e os compostos nitrogenados, como os alcaloides e glicosídeos cianogênicos.

O valor medicinal dos metabólitos secundários está no fato de que estes desempenham diversas atividades farmacológicas, tais como atividade antifúngica e antibacteriana, atividade analgésica, anti-inflamatória, antiespasmódica, antialérgica, antitumoral entre outras, relacionadas aos princípios ativos presente em cada espécie vegetal, tanto em misturas complexas ou substâncias puras (FILHO; YUNES, 1998).

Dentre os grupos químicos de metabólitos secundários, os polifenóis apresentam uma grande diversidade química e uma variedade de funções, caracterizados por apresentar em sua estrutura anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (Figura 3), incluindo seus grupos funcionais, nas formas simples ou de polímeros (ANDREO; JORGE, 2006; SANTOS, 2007; TAIZ; ZEIGUER, 2013).

Os compostos fenólicos são agrupados de acordo com o tipo de esqueleto principal e podem ser classificados como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos e lignanas. Variam de moléculas simples a compostos altamente polimerizados e podem ser encontrados na forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcares unidos aos grupos hidroxilas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).



Figura 3: Estrutura básica de um fenol.

Fonte: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>

Uma das principais funções conhecidas dos compostos fenólicos é sua capacidade antioxidante, atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático que reduz os radicais livres, produzindo radicais fenoxila estabilizados por ressonância (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Juntamente com o ácido ascórbico, vitamina E e os carotenoides, os fenóis são antioxidantes de natureza exógena (DELMONDES et al., 2013), adquiridos a partir da dieta.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes ocorrem por complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição das enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e ou por modulação de vias sinalizadoras celulares (OLIVEIRA et al., 2009).

Os antioxidantes primários atuam sequestrando os radicais livres, atrasando ou inibindo o início ou interrompendo a propagação da autoxidação enquanto que os antioxidantes secundários diminuem a taxa de oxidação por diferentes formas, podendo quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repor hidrogênio para os antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos a espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete, entre outros (TIVERON, 2010).

Substâncias que fazem parte de grupos químicos com reconhecido poder antioxidante e que podem ser responsáveis pela ação farmacológica da espécie *Richardia brasiliensis* foram isolados e identificados, com destaque para o isolamento dos flavonoides canferol e isorametina-3-O-rutinosídeo, cumarinas como a cumariletifina, escopoletina, cedrellopsina, norbraylina e a braylina. (PINTO et al., 2008; SOUZA, 2009).

Além dos polifenóis, também foram identificados em *R. brasiliensis* alcaloides, esteroides, triterpenos como o ácido oleanólico, resinas e ácidos orgânicos como o ácido p-hidroxibenzoico e ácido m-metoxi-p-hidroxibenzoico (PINTO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009).

A família das Rubiáceas está inserida na ordem Gentianales juntamente com Gentianaceae e Apocynaceae e se destacam na produção de alcaloides, principalmente indólicos monoterpênicos (BOTH, 2005), sendo rara a presença destes em outras ordens (SCHRIPEMA; DAGNINO; GOSMANN, 2007).

Os alcaloides são substâncias de baixo peso molecular e caracterizados pela presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura básica (PROBST, 2012). A maioria dos alcaloides são derivados dos aminoácidos e constituem um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural devido aos rearranjos do esqueleto original. A partir de aminoácidos alifáticos, origina-se os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos e piperidínicos, e os aminoácidos aromáticos originam os alcaloides isoquinolínicos e indólicos (HENRIQUES et al., 2007; OLIVEIRA, 2008).

Os alcaloides são normalmente sintetizados no retículo endoplasmático rugoso (RER) e juntamente com uma diversidade de proteínas, são transportados ao vacúolo celular. Característica marcante dos alcaloides é que geralmente estes são sintetizados em uma

determinada parte da planta e transportados e acumulados em outra, dependendo do táxon (RINNET, 2010).

Os alcaloides indólicos presentes em Rubiaceae são derivados do ácido aminado triptofano e segundo Farias (2006) os alcaloides indol monoterpênicos têm sido investigados para uma grande variedade de efeitos farmacológicos, tais como contraceptivo, antitumoral, anti-inflamatório, antimalárico, anti-HIV, bactericida, leishmanicida, além de atividades estimulatórias sobre o sistema nervoso central.

Os terpenoides, também encontrados em *R. brasiliensis* são produtos naturais com esqueletos de carbono derivado do isopreno, são substâncias insolúveis em água e sintetizados a partir de acetil CoA ou intermediários glicolíticos e constituem o maior grupo dos produtos secundários (TAIZ; ZEIGUER, 2013).

Estão presentes em parte da composição dos óleos voláteis das plantas, ocorrendo uma mistura de monoterpenos (duas unidades de C₅) e sesquiterpenos (quatro unidades de C₅) e desempenham funções no crescimento e desenvolvimento vegetal, inibem o forrageio de insetos e mamíferos herbívoros devido a sua toxicidade e atuam como alelopáticos (SPITZER, 2007; TAIZ; ZEIGUER, 2013).

Os triterpenos constituem o grupo mais importante de terpenoides e apresentam propriedades medicinais importantes especialmente como anti-inflamatórios, analgésicos e efeitos antitumorais (NIERO; MALHEIROS, 2007).

O ácido oleanólico, um triterpeno, foi identificado no extrato bruto de folhas e raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg, uma espécie pertencente à família Rubiaceae, e apresentaram significativa atividade anti-inflamatória (TESTA et al., 2012). Já em *R. brasiliensis*, a atividade antimicrobiana frente a vários microrganismos, foi relacionada à presença de flavonoides e terpenos presentes em sua composição química (FIGUEIREDO et al., 2009).

2.5. Testes histoquímicos

A histoquímica tem sido amplamente aplicada permitindo localizar e identificar *in situ* compostos estruturais e de reserva proveniente do metabolismo primário e secundário das plantas, através de reações cromáticas, nos diferentes tecidos vegetais (FILHO, 2008;

VENTRELLA et al., 2013) e conhecer o local de síntese e acúmulo. Estas análises são essenciais para a caracterização farmacognóstica da droga vegetal e juntamente com análises fitoquímicas avaliam os constituintes químicos e sua presença, qualitativamente (RINNET, 2010).

Os testes histoquímicos são realizados e comparados com material padrão da espécie, não submetidos a reagentes, evitando interferências na pigmentação natural da substância analisada (SILVA, 2014), denominado branco. Controles positivos também são necessários nas análises histoquímicas, uma vez que plantas que classicamente possuem os compostos que deseja observar, são analisados conjuntamente.

Substâncias colorimétricas reagem diferentemente nos tecidos, evidenciando uma variedade de colorações e intensidades que permitem distinguir as substâncias entre si. Porém alguns desses reagentes utilizados nos ensaios cromáticos, não são específicos para determinadas substâncias. No grupo dos polifenóis temos substâncias diferentes que quando submetidos a uma solução alcalina, devido a sua estrutura química como a presença de anel aromático, reagem de forma semelhante, não sendo possível a determinação sem uma análise complementar (COSTA, 1982; SIMÕES et al., 2007).

Na espécie *Bathysa cuspidata* (A. St.-Hil.) Hook. f., Rubiaceae, em análise histoquímica utilizando cloreto de alumínio e acetato neutro de chumbo não foram observados os flavonoides. Enquanto que os mesmos foram identificados através da CCD e da CLAE, juntamente com cumarinas e alcaloides, triterpenos e taninos (COELHO et al., 2012).

Richardia brasiliensis está caracterizada macroscópica e microscopicamente e na análise histoquímica foi observado a presença de idioblastos com ráfides de oxalato de cálcio, grãos de amido e compostos fenólicos (SOUZA, 2009; FIGUEIREDO et al., 2010),

2.6. Ciclo celular, atividade antiproliferativa e genotóxica

Em organismos multicelulares, as divisões das células compreendem uma série ordenada de eventos macromoleculares, que levam à produção de células-filhas com igual conteúdo genético aos da célula-mãe, essas divisões junto com o aumento do volume celular, proporcionam o desenvolvimento dos organismos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

A proliferação celular é um processo extremamente coordenado, e juntamente com a apoptose, o organismo controla e mantém constante o número de células em tecidos e órgãos, eliminando as células danificadas e indesejáveis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Durante as divisões celulares a interfase é o período de crescimento e a mitose é a divisão em duas células-filhas. Na interfase há três períodos sucessivos, sendo a fase G1 caracterizada pela expressão dos genes e síntese de proteínas, fase S ocorre a replicação do material genético e G2 o crescimento e síntese de outras proteínas necessárias a divisão (SOUZA, 2004).

Na mitose ou fase M, a célula passa por quatro etapas bem caracterizadas (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e após, a citocinese, originando duas células filhas idênticas a célula mãe (SOUZA, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

O mau funcionamento nos processos de divisões celulares leva ao aparecimento de aberrações cromossômicas e mutações, favorecendo o desenvolvimento de algumas doenças dentre elas o câncer (SOUZA, 2011). Este é caracterizado como uma proliferação celular desordenada e descontrolada de algumas células que advém da ruptura do equilíbrio entre a apoptose e a proliferação celular, formando os tumores (SOUZA, 2004; FERREIRA; NARDIM, 2015).

O tratamento para esse mau funcionamento das células, muitas vezes provém de substâncias naturais, sendo que estes tem sido o pilar da quimioterapia no tratamento do câncer nos últimos 30 anos (BARBERENA et al., 2004).

De acordo com Costa-Lotufo et al. (2010) e Unatti et al. (2013), 60% dos fármacos usados no tratamento de câncer, nas últimas décadas, são de origem natural (Fig. 4) (SOUZA, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2005; BRANDÃO et al., 2010; COSTA-LOTUFO et al., 2010; KAUR; KAPOOR; KAUR, 2011; UNATTI et al., 2013).

Fármaco	Fonte	Alvo Molecular	Indicação terapêutica
Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/Microtúbulos	Leucemia linfoblástica
Vincristina			aguda; câncer de
Vindesina			testículo; doença de
Vinorelbina			Hodkin
Paclitaxel			Câncer de mama
Docetaxel	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de pulmão,
Podofilotoxina			ovário e testículo
Etoposídeo			Leucemia linfocítica
Teniposídeo			aguda
Camptotecina	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon
Topotecano			
Irinotecano			

Figura 4: Exemplo de produtos naturais ou fármacos derivados de plantas, utilizados na terapia do câncer. Fonte: Costa-Lotufo et al. (2010).

No geral os medicamentos anticancerígenos afetam as células normais, de modo que o uso de extratos, substâncias isoladas ou produtos derivados de plantas no tratamento do câncer possuem forte potencial terapêutico (SANTOS; PINHEIRO, 2014).

Apesar da atuação farmacológica das plantas, estudos de toxicidade são essenciais, pois muitas substâncias presentes na composição química dos vegetais utilizados como medicinais podem ser mutagênicos e até carcinogênicos, podendo causar mais danos à saúde do que benefícios (COELHO, 2013).

Segundo a RE nº 90 (ANVISA, 2004) é necessário o estudo da toxicidade pré-clínica para o registro e renovação de fitoterápicos ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido. Para avaliar efeitos antiproliferativos, genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos, de produtos naturais, vários métodos *in vitro* e *in vivo* são utilizados atualmente. O teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART) utiliza como bioindicador para genotoxicidade o organismo teste *Drosophila melanogaster* (OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2004), o teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutações (MOREIRA et al., 2002; VARANDA, 2006).

Outro teste utilizado para a avaliação toxicológica bastante difundido e preconizado por agências internacionais é o ensaio do micronúcleo em ratos. É um teste *in vivo* e avalia produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial (STANGE et al., 2009). Além destes, outros testes ainda estão incluídos nas listas das análises de substâncias com

potencial tóxico e genotóxico, tais como o ensaio Cometa que detecta lesões genômicas (SILVA, 2008; DUARTE et al., 2015) e testes em culturas de células que pode determinar a citotoxicidade de uma substância (DENNY et al., 2007; SILVA et al., 2011).

A capacidade de proliferação celular e a genotoxicidade das substâncias também podem ser avaliados através da utilização do teste de *Allium cepa*. Este ensaio é um método de baixo custo, rápido, e de alta sensibilidade, sendo considerada a cebola, como um organismo padrão, apresentando correlação com outros sistemas teste. É um teste validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para a análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (SILVA et al., 2004).

Neste modelo *in vivo*, (Figura 6) as raízes em crescimento permanecem em contato direto com a substância testada, o tecido meristemático sofre constantes divisões e o número cromossômico é bem definido e reduzido ($2n=16$) com tamanho suficiente para facilitar a visualização (CHAUAHN; SAXENA; GUPTA, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2006; COELHO, 2013).

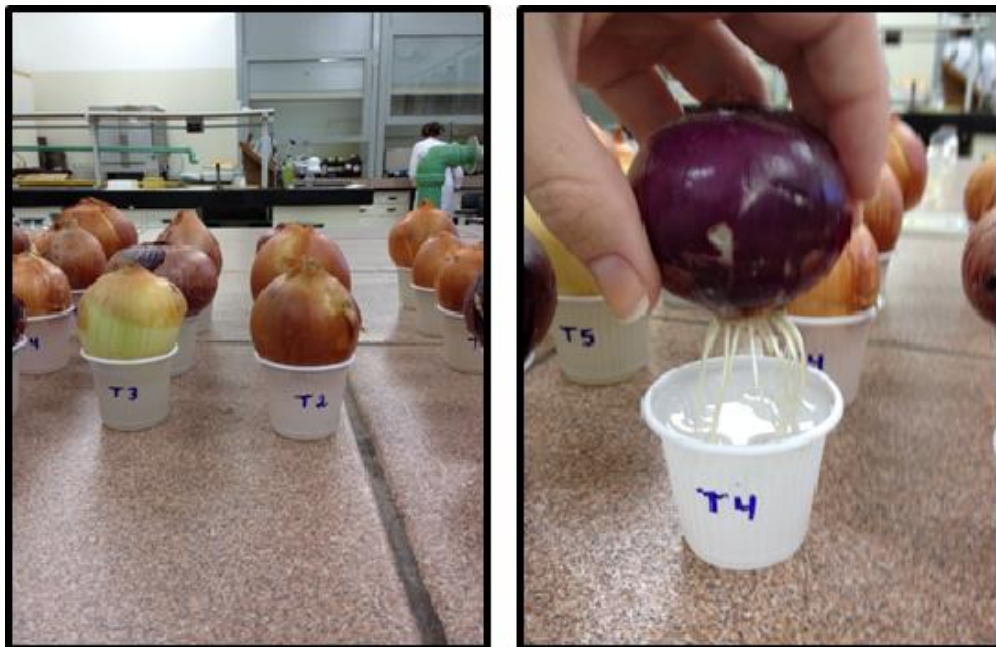


Figura 5: *Allium cepa* em contato com a substância a ser testada.
Fonte: Dornelles, R. C.

A proliferação celular pode ser determinada através do índice mitótico, o qual é obtido a partir do número de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase dividido pelo número total de células observadas (GADANO et al., 2002; VIEIRA et al., 2009).

Substâncias potencialmente genotóxicas podem interagir com os ácidos nucleicos levando à alterações cromossômicas (VARANDA, 2006; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012) e podem ser visualizadas durante o ciclo celular, evidenciando a mutagenicidade ou genotoxicidade de determinada substância, sendo as principais anormalidades cromossômicas anáfases e metáfases irregulares, micronúcleo, células binucleadas e células aderentes, quebras cromossômicas, pontes e cromossomos perdidos ou retardatários (PING et al. 2012; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Frescura (2012) avaliou o potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* e *Psychotria birotula*, Rubiáceas, no ciclo celular de *A. cepa* e observou que ambas as espécies não apresentaram potencial antimutagênico, ou seja, não foram capazes de reverter alterações causadas por algum agente mutagênico, porém apresentaram potencial em inibir as divisões celulares, diminuindo a proliferação celular dependentes da concentração dos extratos.

Extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less) DC e *Baccharis articulata* (Lam) Pers., independente das concentrações testadas, apresentaram potencial antiproliferativo, que foi associado à presença de taninos, no entanto estes extratos causaram aberrações cromossômicas em células de *A. cepa* (FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

Já no estudo realizado por Ping et al. (2012) nas raízes de *A. cepa*, o extrato metanólico de *Euphorbia hirta* L., apresentou índice mitótico mais baixo quando foram utilizadas concentrações mais altas dos extratos, porém apresentou maior porcentagem de aberrações nas células conforme essas concentrações aumentaram, demonstrando que a espécie é genotóxica para esse organismo padrão.

MANUSCRITO 1 - Seasonal background of the physico-chemical quality control parameters and phytochemical profile of *Richardia brasiliensis* GOMES.

Submetido para a revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

MANUSCRITO 2 - Análise histoquímica de folhas e caules de *Richardia brasiliensis* GOMES (RUBIACEAE).

MANUSCRITO 3 - Potencial antiproliferativo e genotóxico dos extratos e frações de *Richardia brasiliensis* GOMES sobre o sistema teste de *Allium cepa*.

Seasonal background of the physico-chemical quality control parameters and phytochemical profile of *Richardia brasiliensis* GOMES

RAFAELA CASTRO DORNELLES^{1*}; GABRIELA CAMERA LEAL¹; ANA CARLA
DECIAN¹; DANIELE DAMIAN DOS SANTOS¹; GABRIEL AUGUSTO RADISKE¹,
RACHEL DE LIMA¹; RITIEL CORREA CRUZ¹; JULIANA CALIL BRONDANI¹;
MELÂNIA PALERMO MANFRON¹.

¹Federal University of Santa Maria, RS
*Street Avenue Roraima, 1000
Suburb Camobi
Science Center of Healths / Building 26
Room 1137
Post code: 97015-900
Santa Maria/ Rio Grande do Sul
rafacdornelles@gmail.com

ABSTRACT

Richardia brasiliensis Gomes is an herbaceous species classified within the Rubiaceae family. This species is commonly present in regions with intense agricultural activity and is used in popular medicine as antiemetic, anti-diabetic, and anthelmintic against haemorrhoids, cure eczema and burns. This research determined the quality control parameters of the herbal drug, quantified secondary metabolites by spectrophotometry, characterized compounds with colorimetric reactions and identified and quantified two polyphenolic substances by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD) in *R. brasiliensis* within different seasons of the year. The quality of the herbal drug and the concentration of active substances varied in different periods, with a higher yield of the crude extract and a higher concentration of flavonoids in April (autumn). The extraneous material and the water percentage were found within the recommended values by the Brazilian Pharmacopoeia. The swelling index signalled the presence of mucilaginous substances and, the levels of total and acid-insoluble ash showed high results when compared to other species. Through colorimetric reactions the presence of anthocyanin glycosides, tannins, amino groups, steroids and/or triterpenes, alkaloids, coumarins, flavonoids and organic acids was determined.

KEY WORDS: Ipecac-white. Rubiaceae. Dosing metabolites. HPLC-DAD. Colorimetric reactions. Seasoning variation.

Estabelecimento sazonal dos parâmetros de controle de qualidade físico-químico e perfil fitoquímico de *Richardia brasiliensis* GOMES

RESUMO

Richardia brasiliensis Gomes é uma espécie herbácea, classificada dentro da família Rubiaceae, presente em regiões com intensa atividade agrícola e utilizada na medicina popular como antiemética, antidiabética, vermífuga e contra hemorroidas, na cura de eczemas e em queimaduras. Esta pesquisa, determinou parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal, dosou metabólitos secundários através de espectrofotometria, caracterizou compostos através de reações colorimétricas e identificou duas substâncias polifenólicas através de HPLC-DAD em *R. brasiliensis* G. nas diferentes estações do ano. A qualidade da droga vegetal, e a concentração de substâncias ativas, variaram nos diferentes períodos, apresentando um maior rendimento do extrato bruto e uma maior concentração de flavonoides em Abril (outono). A matéria estranha e a porcentagem de água determinados estão dentro dos valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira. O índice de intumescência sinalizou a presença de substâncias mucilaginosas e os teores de cinzas totais e insolúveis em ácido, apresentaram resultados elevados quando comparados com outras espécies. Através de reações colorimétricas foi determinado a presença de heterosídeos antociânicos, taninos, amino-grupos, esteróides e/ou triterpenos, alcaloides, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides.

UNITERMOS: Poaia branca. Rubiaceae. Doseamento de metabólitos. HPLC-DAD. Reações colorimétricas. Variações sazonais.

INTRODUCTION

Richardia brasiliensis Gomes is a South American native species, belonging to the family Rubiaceae, sub-family Rubioideae, tribe Spermacoceae (Lorenzi, 2008). This plant is part of the poaia groups, commonly known by poaia-branca, ervaço or ipeca.

R. brasiliensis is typically found in regions with intense agricultural activity, such as the Brazilian South and Midwest regions. This herb grows spontaneously in crops and is considered one of the biggest problems of weed infestations in agricultural areas (Rosseto *et al.*, 1997; Monquero, Cury, Christoffoleti, 2005; Schott, Canto-Dorow, 2011). It is an annual cycle species and has capability to adapt in to different planting systems, infesting annual or

perennial crops. It grows near the soil surface and has a thick pubescent stem. Its inflorescence is in a glomerular form surrounded by 2, 4 or 6 foliaceous bracts, its flowers are generally hexamers, the sepals are usually in number of 6 white or pinkish corolla, with a ring of hairs on its inner face (Lorenzi, 2008).

Previous researches (Pinto, 2008; Pinto *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2009; Souza, 2009; Souza *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2013) identified coumarins, flavonoids, alkaloids, steroids, triterpenes, phenolic compounds and organic acids, and those are important substances which justifies the usage of this plant as a therapeutic agent resource. Furthermore, *R. brasiliensis*, in popular medicine, is used as antiemetic, antidiabetic, anthelmintic in the haemorrhoidal treatment, cure eczema and burns (Souza, 2009).

The Rubiaceae family is economically important and is being used in the food, ornamental and medicinal fields (Coelho *et al.*, 2006). Moreover, this family has a big plasticity in its chemical composition, presenting a huge variety of compounds with potential pharmacological effects (Souza, Mendonça, Silva, 2013).

To use this species as an efficient and safe drug it is important to establish the quality control parameters of the herbal drug. It is also important to comprehend how different seasons of the year can influence the plants biological system, increasing or decreasing the quality and concentration of active substances presents in the plant.

The Rubiaceae family is historically important in the medicinal field and *Richardia brasiliensis*, presents important chemical compounds justifying the seasonal studies to establish physical and chemical quality control parameters and phytochemical profile of this species.

MATERIALS AND METHODOLOGY

Botanical material

The herbal material is composed by the aerial parts of *R. brasiliensis* and was collected at the campus of the Federal University of Santa Maria (UFSM) (S29°43.277' W053°42.844'). One sample of this plant was identified by the Dr. Thais do Canto-Dorow and

the proof material was deposited on the herbarium in the Biology Department of Santa Maria (SMDB) at UFSM, registered with the number 13966.

Harvest of material were made during summer, autumn, winter and spring in the months of January (JA), April (AP), August (AG) and October (OC) respectively during the year of 2013. After the harvest, the material was dried in a circulating air oven at a temperature of $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for a period of seven days and ground in a Wiley mill.

The crude extract (CE) hydro alcoholic (70%) was obtained by maceration, with renewal of the solvent until the depletion of chemicals, then it was dried with lyophilisation and the yield calculated.

Quality control parameters

The quality control parameters of the herbal drug were made by physico-chemical tests (purity and integrity test) according to the 5^a edition of Brazilian Pharmacopoeia (2010).

The extraneous material, swelling index, water content, content of total ash and acid-insoluble ash, were assessed directly on the herbal drug.

Spectrofometric quantification of secondary metabolites was performed in the CE.

The quantification of total polyphenols were made from Chandra and Mejia proceedings (2004). For this determination, the reagent Folin-Ciocalteu (1N) was used and the results were expressed in equivalent gallic acid milligrams per gram of dried extract. With these results it was made possible to create an equation for the standard curve at concentrations of 1.0; 3.0; 5.0; 10.0 and 20.0 $\mu\text{g/mL}$, being $y = 0.0386x - 0.0181$ with r of 0.9993. The extracts were made at 0,04% of distilled water and the readings were performed in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1201) at a wavelength of 730 nm.

In flavonoids quantification, quercetin was used as standard, and a solution of aluminium chloride, as colour reagent. The samples were prepared at 0.04% of dry extract in 70% methanol. The total flavonoid content is expressed in equivalent quercetin milligrams per gram of each extract. The equation obtained for the standard curve of quercetin at concentrations of 5.0; 10.0; 15.0; 25.0 and 30.0 $\mu\text{g/mL}$ was $y = 0.0127x - 0.0019$ with r of 0.9952. The reading was performed at 425 nm (Rio, 1996).

The method of vanillin, according to Agostini-Costa, Lima and Lima (2003), was used to determine tannins, using catechin as a pattern and the reading done at 490 nm.

The total content of tannins was expressed as milligrams of equivalent catechin milligrams per gram of dry extract each. The concentrations used for obtaining the calibration curve were 25.0; 150.0; 300.0; 450.0; 600.0; 800.0 and 900.0 µg/mL and the equation obtained was $y = 0.0002x + 0.0024$ with r of 0.9973.

Identification of the chemical compounds

The phytochemical characterization was realised by colorimetric methods, according to Moreira (1979), Wagner and Bladt (1996), Costa (1982). To research anthocyanin glycosides, saponins, cyanogenic glycosides, tannins and amino groups was prepared an aqueous extract at 20%; and a 20% alcoholic extract for alkaloids, flavonoids, coumarins, anthraquinones, steroids and triterpenes. The analyses were made in triplicate.

Phytochemical profile

The crude extracts were analysed by chromatographic analysis using a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array detector (HPLC-DAD) to chemically identify the polyphenolic constituents of *R. brasiliensis* according to the method published by Evaristo and Leitão (2001) adapted.

To separate the compounds by HPLC-DAD was used liquid chromatography (Shimadzu, Kyoto/Japan) compound pump model LC-20AT, auto sampler SIL-20A, detector SPD DAD-M20A and communicator 20A and CBM controlled by software LC SP1. The analytical column used was Shim-pack CLC-ODS (M), 5 µm particle diameter, dimensions of 4.6 mm x 150 mm. The elution gradient occurred flow 0.9 mL/min using two mobile phases: A, consisting of 2% acetic acid in water and, B, using only methanol UV/HPLC. The sample injection volume was 40 µL, and the accompanied photodiode array detection system for wavelengths between 230-400 nm for 55 minutes. The identification of the polyphenols has been carried out by comparing the retention time of the samples and the absorption spectrum in cited band, with the standard solutions and quantitation by preparing standard curves. The

standards of phenolic compounds tested were: pyrogalllic acid, gallic acid, pirocatechin, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin and kaempferol.

The compounds identified in the extracts were quantified by preparing standard curves, through dilution of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution in MeOH UV/HPLC to achieve the following: 5.0; 10.0; 25.0; 35.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solutions. The quantified concentrations of the substances were calculated from the equation of the line and results were expressed in equivalent milligrams of each pattern for each gram of the extract.

Statistics analysis

The data obtained from the extracts made in the different seasons where evaluated by analysis of variance and the comparison among the medians was generated through the Tukey test (≤ 0.05), using a specific program.

RESULTS AND DISCUSSING

Quality control parameters

The quality control parameters for the herbal drug, *R. brasiliensis*, in the four seasons (Table I) show that environmental change to which the plant is subjected, can be responsible for the difference in these established parameters. This was also discussed by Gobbo-Neto and Lopes (2007), who attributes the variation in the secondary metabolism of plants due to harvest conditions, and the environmental influence (light, altitude, pollution, nutrients, radiation, water availability, temperature, etc.).

TABLE I - Physico-Chemical parameters of quality control *Richardia brasiliensis*.

TIME OF COLLECTION	EXTRANEANOUS MATERIAL (%)	SWELLING INDEX (mL)	WATER IN THE PLANT DRUG (%)	TOTAL ASH (%)	ACID INSOLUBLE ASH (%)
JÁ	0.12 ^b ± 0.12	7.74 ^a ± 0.20	9.63 ^a ± 0.14	14.13 ^c ± 0.46	1.40 ^c ± 0.56
AP	0.27 ^{ab} ± 0.13	3.56 ^b ± 0.18	6.33 ^d ± 0.12	20.02 ^b ± 2.12	7.78 ^b ± 1.18
AG	0.53 ^a ± 0.10	5.34 ^{ab} ± 1.57	7.57 ^c ± 0.34	30.01 ^a ± 2.49	16.45 ^a ± 2.65
OC	0.55 ^a ± 0.07	6.16 ^a ± 0.10	8.86 ^b ± 0.18	24.83 ^a ± 0.96	10.21 ^{ab} ± 0.52

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October. Means followed by similar letters do not differ by Tukey test at 5% of significance level.

The percentage of the strange matter, which means the presence of mineral impurities or other parts of the plant than the drug Brazilian Pharmacopoeia itself that was collected was bigger during OC (0.55%), and did not significantly differ from AG period (0.53%). The percentage of drug's impurities elements on the drug should not be more than 2% m/m, (Brazilian Pharmacopoeia, 2010) and the four samples tested presented results below this level. The herbal drug to be used must be free from any form of strange matter, and drugs contaminated by fungus, insects, or other materials should not be used for medicinal purposes (OMS, 1998).

The foreign material observed in these samples is mostly compound by soil particles, which can be explained by this species growing close to the ground and have a thick stem hair, increasing the contact between the plant and soil. Nevertheless, the World Health Organization (1998) indicates that any foreign material such as earth, stones, sand and dust have to be removed before the usage of the herbal drug.

The swelling of the drug, is related to the presence of mucilage and other polysaccharides present in *R. brasiliensis*. As can be observed, the values obtained for the swelling, had the highest rates in JA (7.74 mL) and OC (6.16 mL) with no significant difference. In AG it has given a rate of 5.34 mL and 3.56 mL on AP.

The gravimetric method was used for the analysis of water in the herbal drug. As it is shown, there were significant differences in the samples, and it was observed a higher water content in JA (9.63%).

The Brazilian Pharmacopoeia (2010), does not determine the optimum range of water content in the dried plant, but the Brazilian Pharmacopoeia 1988, requested for values between 8 and 14% (m/m), thus, the plant material collected in JA (9.63%) and OC (8.86%)

are within this range and the material collected during AP (6.33%) and AG (7.57%) are below. The residual water found in the herbal drug may lead to microbial contamination and degradation of the chemical constituents by hydrolysis (Michelin *et al.*, 2010), therefore a lower amount of residual water, as the ones observed in *R. brasiliensis*, is recommended for a better stability of the herbal drug.

The content of total ash, provides the amount of material that remain adherent to the drug after incineration, determining the presence of a "physiological ash", which are derived from plant tissue itself and ash "non-physiological" which is a residue of impurities that adhere to the surface of the plant as sand and soil (WHO, 1998).

Samples of AG and OC had the highest total ash content (30.01% and 24.83% respectively), with no significant difference between them. The lowest total ash value occurred in summer, 14.13%, which matches with the value (14.05%) that was found by Figueiredo *et al.* (2010) in the aerial parts of *R. brasiliensis*.

In the botanical and chemical characterization in *Rudgea viburnoides*, another species of the Rubiaceae family, Alves *et al.* (2004) found ash content between 10 and 11%. While Costa *et al.* (2009) determined a percentage of 2.02% in *Cynara scolymus* an Asteraceae and Vigo, Narita, Marques (2004), found values of total ash of 6.5% for both the winter and spring, 4.3% in the summer and 4.4% in the autumn when they analyzed the roots of *P. glomerata* belongs to the Amaranthaceae in different seasons.

The values in *R. brasiliensis*, in all seasons, are higher than the ones found in these studies, even when related species belonging to the same family. This parameter may be related to the type of habits of this species, as it is an herbaceous with prostrate development.

The acid-insoluble ash, allows to determine the presence of inorganic impurities, such as silica and siliceous constituents of the drug (Macedo *et al.*, 2013). Levels up to 1% are acceptable when considered a plant that is not rich in silicic acid or silicates (Frasson, Bittencourt, Heinzmann, 2003). The levels found in the species under study, exceeded this value in all seasons.

The highest total polyphenols content was observed in the OC (30.67 mg/g) and the highest concentration of flavonoids was found in the AP (28.90 mg/g). In contrast, the higher amount of tannins was found in the JA (38.54 mg/g) (Table II).

TABLE II -. Dosing total polyphenols, flavonoids and tannins within the seasons.

mg/g of CRUDE EXTRACT				
CONSTITUENTS	JA	AP	AG	OC
TOTAL POLYPHENOLS	26.37 ^{dB} ±0.46	28.09 ^{bA} ±0.07	27.32 ^{cA} ±0.16	30.67 ^{aA} ±0.25
FLAVONOIDS	15.73 ^{bC} ±0.39	28.90 ^{aA} ±0.73	27.75 ^{aA} ±0.57	27.50 ^{aB} ±1.09
TANNINS	38.54 ^{aA} ±0.19	12.45 ^{dB} ±0.12	15.82 ^{cB} ±0.66	17.20 ^{bC} ±0.19

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October. Means followed by the same lower case letter in line indicate comparison between the different collection months, while capital letter in the column indicate comparison between different constituents of the same collection. Tukey test at 5% of significance.

The concentration of total polyphenols, flavonoids and tannins in different plant species, has varied according to seasonal changes, demonstrating the importance that these factors have on the secondary metabolism.

Regarding to the concentration of flavonoids in *Davilla rugosa*, the highest levels of these active group of compounds, were found in summer and autumn in the Brazilian Southeast region (Macedo *et al.*, 2013). As flavonoids play a role as shields against photo-destruction, the increase in its concentration can be directly correlated with the increase in the intensity of solar radiation.

The water stress conditions to which the plant is subjected can lead to an increase in the concentration of flavonoids. In *Eugenia uniflora*, there is an increase in production when there is the combination of high solar irradiation and the lack of rain, which is related to the dry season (April to September) in the Midwest region (Santos *et al.*, 2011).

In *R. brasiliensis* the highest flavonoid content was observed during the autumn, in April and, the lowest, in January, during the summer. According to the data obtained from the National Institute of Meteorology (INMET), in both collections, January and April, the rainfall were close (145.3 mm and 147.4 mm respectively), but the insolation period has varied considerably (286.0 for the month of January and 209.0 for the month of April), which may explain the difference in concentrations of flavonoids.

The values obtained for tannins differ of those found in flavonoids. The highest concentration of tannins was observed in January and the lowest in April. For *D. rugosa*, species, the highest tannins levels was obtained in the summer (Macedo *et al.*, 2013). These results can be explained as the production of tannins become increased during warm and

humid periods, which coincides with the proliferation of insects and pathogenic microorganisms, It is well known that plants need a higher level of endogenous defenses to protect themselves during these periods (Barbehenn *et al.*, 2009).

The differences in the concentrations of chemicals in *R. brasiliensis* as in other species for medical use can make possible to infer that variations occurring in the biosynthesis of secondary metabolites is a complex process and it is subject to the influence of different environmental variables, such as biotic and abiotic factors influencing both the quality and the quantity of secondary products (Gobbo-Neto, Lopes, 2007).

Chemical Constituents

The chemical constituents of the aerial parts of *Richardia brasiliensis* were characterized by colorimetric reactions (Table III).

TABLE III - Phytochemical characterizing of *Richardia brasiliensis*.

CLASS OF COMPOUNDS	EA	EH
Anthocyanin glycosides	+	-
Saponinics glycosides	-	-
Cyanogenic glycosides	-	-
Gums, mucilage, tannins	+	-
Condensed tannins	+	-
Hydrolysable tannins	+	-
Amino groups	+	-
Steroids and (or) triterpenes	-	+
Cardioactive glycosides	-	-
Alkaloids	-	+
Free ortho and meta phenols	-	+
Free para phenol	-	+
Coumarins	-	+
Organic acids	-	+
Phenols	-	+
Anthraquinones	-	-
Flavonic glycosides	-	+

(EA): water extracted; (EH): hydro alcoholic extract. (+): Presence; (-): Absence

The results of *R. brasiliensis*, matches with Figueiredo *et al.* (2010), who found alkaloids, flavonoids, steroids, triterpenes, coumarins and resins, the aerial parts of *R. brasiliensis* and coumarins, steroids, triterpenes, resins at its roots. This study also identified the presence of anthocyanin glycosides, tannins, amino groups and organic acids.

The presence of these substances in this species, justify its popular use, and demonstrate its importance as a medicinal drug. The Rubiaceae species have huge economical and pharmaceutical importance, because they are rich in secondary metabolites belonging to the iridoid class, terpenoids, flavonoids, tannins, quinones and especially alkaloids (Costa *et al.*, 2006).

According to Bolzani *et al.* (2001), the Rubiaceae family, has chemical markers for each one of the subfamilies, especially in Rubioideae, anthraquinones substances, which has not been identified by the method used.

Yield and profile of the crude extracts

The tests for determining the performance of CE are reported in table IV.

TABLE IV - Yield of the crude extract.

SEASONS	YIELD OF CE (%)
JA	20.30
AP	20.44
AG	19.58
OC	18.33

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October.

Phytochemical Profile

Chlorogenic acid and rutin were identified by HPLC-DAD (Figure 2) in the CE in all seasons and chromatographed under identical conditions to the commercial standards (Figure 1) to give 16.5 minutes retention time for chlorogenic acid, visualized at a wavelength of 327 nm and 28.6 minutes for rutin at a wavelength of 355 nm.

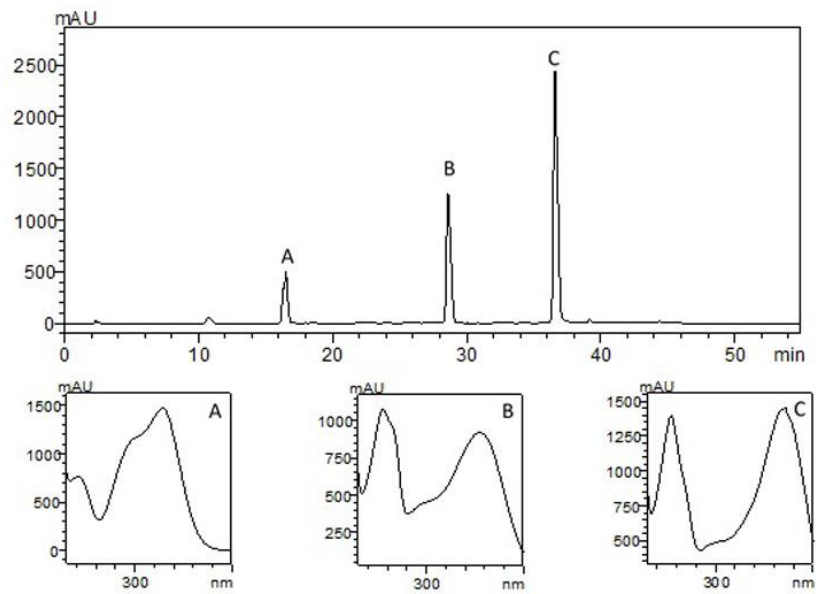


Figure 1: Chromatographic profile by HPLC-DAD, at a wavelength of 355 nm of chlorogenic acid standards (A) obtained in retention time of 16.5 min; rutin (B) with retention time of 28.6 min and quercetin (C), with retention time 36.5 min.

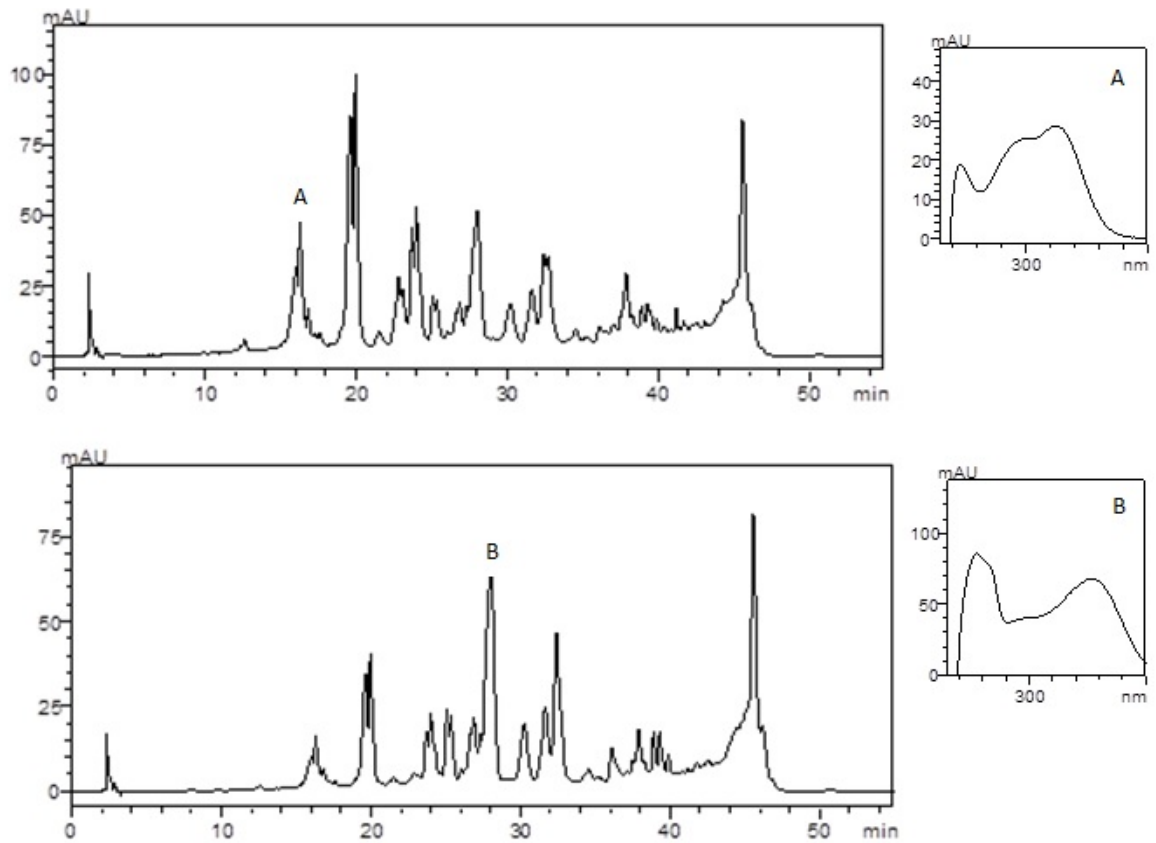


Figure 2: Chromatographic profiles obtained by HPLC-DAD, where it is possible to observe the presence of chlorogenic acid (A) at a wavelength of 327 nm and rutin (B) with a wavelength of 355 nm, in the crude extract of *Richardia brasiliensis* G., obtained from plants collected in winter.

The concentration of chlorogenic acid and rutin were calculated, obtaining the equation line, $y=167629x-352755$ with r of 0.9995 for the chlorogenic acid and, $y=43174x-80246$ with r of 0.9995 for the rutin.

The chlorogenic acid and rutin content identified and quantified in the CE, are reported in Table V.

TABLE V - Chlorogenic acid and rutin concentrations in *Richardia brasiliensis*, in crude extracts (CE) of the different seasons.

SAMPLES	CHLOROGENIC ACID (mg/g)	RUTIN (mg/g)
JA	1.62 ^d ± 0.05	25.12 ^b ± 0.06
AP	1.91 ^c ± 0.11	26.25 ^a ± 0.19
AG	3.21 ^b ± 0.03	13.33 ^d ± 0.62
OC	3.70 ^a ± 0.02	19.34 ^c ± 0.24

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October.

Means followed by similar letters do not differ by Tukey test at 5% of significance level.

The highest concentration of chlorogenic acid occurred in OC (3.701 ± 0.02) and AP the highest concentration of rutin (26.255 ± 0.19).

Samples (CE) were prepared at a concentration of 5 mg/ml and 1.25 mg/mL to measure chlorogenic acid and rutin respectively. For the analysis of rutin was necessary to dilute the samples, because due to its high concentration in CE *R. brasiliensis*, values extrapolated the points used in the preparation of the standard curve.

Medicinal properties attributed to species, may be related to this group of active substances in *R. brasiliensis*. Both constituents identified and quantified, are the polyphenols group of substances with great pharmacological importance because they have effective antioxidant, due to its free radicals scavenging properties, chelate metal ions by intercepting the active oxygen forming stable radicals, thereby protecting the tissues of these free radicals and lipid peroxidation (Wollgast and Anklan, 2000).

CONCLUSIONS

In the analysis of herbal drug, in different seasons, foreign matter and the percentage of water in the herbal drug, are within the recommended values by the Brazilian Pharmacopoeia. The swelling index signaled the presence of mucilaginous substances and the

levels of total and acid-insoluble ash, showed high results when compared to other species. These values might be related to habitat type *R. brasiliensis*.

Regarding the dosages of active compounds, the extract obtained in the autumn, showed a higher yield (20.44%) and a higher concentration of flavonoids (28.9 mg/g), when quantified by spectrophotometer. This result was confirmed when rutin was quantified by HPLC-DAD, determining 26.25 mg/g.

In phytochemical screening, characterization colorimetric reactions were positive for groups of substances such as anthocyanin glycosides, tannins, amino groups, steroids and / or triterpenes, alkaloids, coumarins, flavonoids and organic acids, affirming other studies have determined that the presence of these composed of groups active in the species.

Based on the results, it is clear that the seasonal variation directly influence the quality of plant material and the concentration of active compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Authors would like to thank Dr^a Thais Scott do Canto-Dorow (UFSM) by the identification of the species and Prof. Dr^a Juçara Terezinha Paranhos (UFSM) by assistance with the statistical analyzes.

REFERENCES

AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Quim Nova**, v.26, n.5, p.763-765, 2003.

ALVES, R. M. S.; STEHMANN, J. R.; ISAIAS, R. M. S.; BRANDÃO, M. G. L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.14, n.1, p.49-56, 2004.

BARBEHENN, R. V.; JAROS, A.; LEE, G.; MOZOLA, C.; WEIR, Q.; SALMINEN, J. P. Hydrolyzable tannins as “quantitative defenses”: Limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar. **J Insect Physiol**, v.55, n.4, p.297-304, 2009.

BOLZANI, V. S.; YONG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomic and biological significance. **Recent Res Devel Phytochem**, v.5, p.19-31, 2001.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J of Agri Food Chem**, v.52, p.3583-3589, 2004.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schtdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.16, n.2, p.170-177, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1982, 1032p.

COSTA, L. M.; CARVALHO, A. M.; PEREIRA, R. C.; DELPRETE, P. G.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, C. C.; KATO, L. Avaliação Fitoquímica e Atividade Biológica de *Spermacoce poaya* (Rubiaceae). In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, III, 2006, Goiânia. **Anais eletrônico do III Seminário de Pesquisa e Pós-graduação da UFG**. Goiânia. 2006.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Caracterização física, química e físico-química de extrato seco por nebulização (*spray-dryin*) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Rev Bras Farm**, v,90, n.3, p.169-174, 2009.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v.9, n.2, p.135-141, 2001.

FARMACOPEIA Brasileira. 4ª ed. São Paulo: 1988. pt.1, p.V.4.2.3.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. Brasília: 2010. pt.1, p.192-204.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; PIMENTA, F. C.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZO, L. M. F. PAULA, J. R. Avaliação da

atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.30, n.2, p.193-196, 2009.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade da *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae). **Lat Am J Pharm**, v.29, n.2, p.192-197, 2010.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, n.1, p.35-39, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Boletim Agroclimatológico Mensal. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em: 15 janeiro 2015.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestre, aquáticas, parasitas e tóxicas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 440p.

MACEDO, J. M.; SOUZA, L. G. P.; VALENZUELA, V. C. T.; OLIVEIRA, A. B.; CASTILHO, R. O.; JÁCOME, R. L. R. P. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.34, n.4, p.585-590, 2013.

MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. Convolvulaceae. **Rev Bras Farmacogn**, v.20, n.1, p.18-22, 2010.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v.23, n.1, p. 123-132, 2005.

MORAIS, E. C.; NOGUEIRA, L. F. B.; LEITE, J. L. A.; LUCENA, L. S. M. A. B.; FIGUEIREDO, F. G.; GUEDES, G. M. M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. F. B. M.; LIMA, M. A.; SOUZA, F. H. T.; DIAS, C. S.; COUTINHO, H. D. M. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. **Indian J Tradit Know**, v.12, n.4, p.619-622, 2013.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Complanulaceae. **Tribuna Farm**, v.47, n.1, p.13-39, 1979.

OMS. Quality control methods for medicinal plant materials, 1998. p.122.

PINTO, D. S. **Primeiros estudos quimiotaxonômicos do gênero *Richardia*: fitoquímica da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2008. 145 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; SOUZA, F. H. T.; DIAS, C. S.; BRAZ-FILHO, R.; CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROSSETO, R.; PITELLI, R.M.; PITELLI, R.A. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: Poaia-Branca. **Planta Daninha**, v.15, n.1, 1997.

SANTOS, R. M.; OLIVEIRA, M. S.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. A variação sazonal no teor de fenóis de Folhas de *Eugenia uniflora* L. **Rev Bras Plantas Med**, v.13, n.1, p.85-89, 2011.

SCHOTT, P.C.; CANTO-DOROW, T.S. Benefícios potenciais de plantas daninhas: uma perspectiva de educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.4, n.4, p.524-529, 2011.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Rev Cubana Plant Med**, v.18, n.1, p.140-156, 2013.

SOUZA, F. H. T.; SILVA, T. S.; PINTO, D. S.; MONTES, R. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; DIAS, C. S. Nova cumarina isolada de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Fortaleza. **Anais Químicos para uma potência emergente**. Fortaleza, 2009.

SOUZA, F. H. T. **Estudos fitoquímicos e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 194 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.14, n.2, p.137-144, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. Alemanha: Springer, 1996. 384p.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Res Int**, v. 33, n.6, p.449-459, 2000.

**Análise histoquímica de folhas e caules de *Richardia brasiliensis*
GOMES (Rubiaceae)**

DORNELLES, R. C.^{1,2}; MANFRON, M. P.^{1,2}; OLIVEIRA, J. M. S.¹

¹Departamento de Biologia;

²Departamento de Farmácia Industrial;

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

RESUMO

A espécie *Richardia brasiliensis* Gomes é uma planta pertencente à família Rubiaceae, utilizada na medicina popular como antiemética, antidiabética, vermífuga, contra hemorróidas, na cura de eczemas e no tratamento de queimaduras. Em estudos fitoquímicos anteriores foi determinada a presença de flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, compostos fenólicos, cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos antociâncos, taninos e amino-grupos. Assim, esse estudo teve como objetivo identificar metabólitos secundários nos diferentes tecidos de folhas e caules de *R. brasiliensis*, a partir de testes histoquímicos em microscopia de luz e microscopia de fluorescência. Com a utilização de diferentes reagentes, foram identificados lipídios de reserva e estruturais, compostos fenólicos, antocianinas e alcaloides.

Palavras-chave: Poaia branca. Histoquímica. Reativos. Microscopia de luz. Microscopia de fluorescência.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, conhecida antes mesmo da estória escrita. Em 60.000 a.C. plantas medicinais eram utilizadas em rituais de sepultamentos e em 11.000 a.C. já eram usadas como psicoativas (ROCHA et al., 2015). Um dos mais importantes relatos escritos, ocorreu no Antigo Egito em 2.600 a.C. na qual populações da região da Mesopotâmia utilizavam algumas espécies vegetais para a cura de doenças (YUNES; CALIXTO, 2001).

Pesquisas com plantas medicinais tentam resgatar o conhecimento popular, combinando informações adquiridas junto às comunidades locais que fazem uso da flora medicinal e corroborar através de estudos científicos, comprovando a importância etnofarmacológica da planta.

Para uma planta ser considerada medicinal no Brasil, faz-se necessário uma resposta positiva a ensaios que comprovem as propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas, bem como, o seu grau de toxicidade nas doses compatíveis com seu emprego medicinal (LORENZI; MATOS, 2008).

A espécie em estudo, *Richardia brasiliensis* pertence à família Rubiaceae sendo conhecida popularmente por poaia branca. É encontrada em regiões tropicais e subtropicais, nativa da América do Sul, com ampla distribuição no Brasil principalmente em regiões cultiváveis (ROSSETO; PITELLI; PITELLI, 1997). Na medicina tradicional, é utilizada como antiemética, antidiabética, vermífuga e contra hemorróidas, na cura de eczemas e no tratamento de queimaduras (SOUZA, 2009).

Em estudos anteriores com a *R. brasiliensis*, foram identificadas e isoladas substâncias com propriedades medicinais, tais como flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, compostos fenólicos, cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos antociâncos, taninos e amino-grupos (PINTO 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009). Essas substâncias ativas encontradas em diferentes tecidos vegetais são produtos do metabolismo secundário vegetal e esses compostos orgânicos são os responsáveis pelas propriedades terapêuticas da espécie (LORENZI; MATOS, 2008).

Análises histoquímicas, têm sido amplamente aplicadas e permitem localizar *in situ*, através de reações cromáticas, compostos produzidos pelas plantas, sejam eles

derivados do metabolismo primário ou secundário, permitindo o reconhecimento de sua natureza e locais de ocorrência nos tecidos vegetais (FILHO, 2008).

O objetivo deste trabalho foi realizar testes histoquímicos para a confirmação de algumas substâncias ativas, presentes em *R. brasiliensis*, a partir de cortes transversais nas folhas e caules *in natura* submetidos ao contato com reagentes específicos para evidenciar a presença de compostos químicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas utilizadas para as análises histoquímicas, foram coletadas no campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no município de Santa Maria, RS. A espécie foi identificada pela Dr^a Thais Scott do Canto-Dorow e o material testemunho depositado no herbário do Departamento de Biologia Santa Maria (SMDB) da UFSM, sob o número de registro 13966. O estudo foi desenvolvido no laboratório de Botânica Estrutural, pertencente ao Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM.

Para os testes histoquímicos, foram realizados cortes transversais à mão livre, de folhas e caules frescos, sob estereomicroscópio.

Os grupos químicos averiguados nos tecidos vegetais foram determinados com base em testes fitoquímicos (MOREIRA, 1979; COSTA, 1982; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), cromatografia em camada delgada (WAGNER; BLADT, 1996) e referências bibliográficas da espécie (PINTO, 2008; PINTO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2009; MORAIS et al., 2013).

Diferentes testes histoquímicos foram utilizados para microscopia de luz. Para a detecção de lipídios, foram utilizados os reagentes sudan III (JOHANSEN, 1940), sudan red 7B (BRUNDRETT; KENDRICK; PETERSON, 1991) e sudan black B (PEARSE, 1980). Para a detecção de fenóis o cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e dicromato de potássio (GABE, 1968); para a detecção de taninos foi utilizada a vanilina clorídrica (MACE; HOWELL, 1974); para a detecção de alcaloides foi utilizado o reagente Dragendorff (SVENDSEN; VERPOORTE, 1983) e reagente de Wagner (FURR;

MAHLBERG, 1981). O azul de toluidina foi utilizado para detecção lignina e compostos fenólicos (O'BRIEN; MCCULLY, 1981).

Na microscopia de fluorescência foi utilizada o vermelho neutro (KIRK, 1970) para a detecção de lipídios, e o cloreto de alumínio (CHARRIÉRE-LADREIX, 1976) para a detecção de flavonoides. Para a identificação de cumarinas e flavonoides, foram utilizadas soluções alcalinas de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio (COSTA, 1982; KUSTER; ROCHA, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Análises em microscopia de luz e microscopia de fluorescência, foram realizadas em microscópio Zeiss AxioImage A2 com sistema fotográfico digital Zeiss AxioCam RMc e software ZEN (Zeiss™).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspectos gerais da anatomia de caule e folha de *Richardia brasiliensis*

A análise anatômica indicou nos caules a presença de epiderme simples com tricomas tectores, cutícula lisa, córtex parenquimático composto por poucas camadas de células e sistema vascular secundário, além de medula parenquimática bem desenvolvida (Fig. 1A – 1C).

A folha apresentou epiderme unisseriada com presença de tricomas tectores simples. O tipo de tricoma é uma característica relevante para o controle da qualidade de drogas vegetais, visto que elas são comercializadas na forma rasurada ou pulverizada (OLIVEIRA, 2015).

Os estômatos aparecem em ambas as faces e são do tipo paracítico, caráter comum às espécies da família Rubiaceae (APEZZADO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006; COELHO et al., 2006), porém, a presença de estômatos é quase sempre restrita à face abaxial (MENDONÇA et al., 2013), característica que difere em *R. brasiliensis*, que apresenta folhas anfiestomáticas.

O mesofilo é heterogêneo, com parênquima paliçádico e esponjoso, pluriestratificado (Fig. 1D – 1F). O sistema vascular é formado por um feixe na forma

de arco, apresentando floema na forma de cordões e xilema formado por elementos de vasos.

A presença de idioblastos com drusas, é outra característica bem comum em algumas espécies da família e foi identificado por Souza (2009) no parênquima esponjoso da folha e na região medular do caule de *R. brasiliensis*, porém, nos cortes histológicos analisados neste estudo, não foram observadas drusas nos tecidos.

Ocorrência de compostos químicos nos caules e folhas

A partir do conhecimento prévio realizado em *R. brasiliensis* foi determinado a presença de compostos do grupo dos terpenos, como óleos voláteis e esteróis; compostos fenólicos, como taninos, cumarinas e flavonoides e compostos nitrogenados como os alcaloides, e buscou-se averiguar a presença desses compostos nas folhas e caule da planta através de testes histoquímicos. Na tabela 1 são apresentados os resultados das análises realizada em folhas e caules de *R. brasiliensis*, os compostos químicos pesquisados e os reagentes mais usuais na literatura.

Nos cortes brancos, no qual não foi utilizado reagente, pode-se observar que o limbo foliar apresentou células epidérmicas translúcidas e células do parênquima esverdeado, devido à presença de cloroplastos (Fig. 1D). O caule possui as mesmas características da folha, e destaca-se a presença de antocianinas abaixo da epiderme (Fig. 1B).

Tabela 1 - Grupo de compostos químicos identificados em *Richardia brasiliensis* Gomes, reagentes cromáticos utilizados e órgão no qual foi identificado a substância ativa.

Compostos químicos	Reagentes	Folha	Caule
Lipídios	sudan III	+	+
	sudan black B	+	+
	sudan Red 7B	+	+
	vermelho Neutro	+	+
Compostos Fenólicos	cloreto férrico	-	-
	dicromato de potássio	+	+
Flavonoides	cloreto de alumínio	-	-
Cumarinas/Flavonoides	NaOH/ KOH	+	+
Taninos	vanilina clorídrica	-	-
Alcaloides	Dragendorf	-	-
	Wagner	+	+

(+): presença; (-): ausência

Lipídios

A análise demonstrou a ocorrência de lipídios de reserva e estruturais nas folhas. No mesofilo, em ambas as faces as células apresentam lipídios de reserva na forma de gotas lipídicas com ocorrência mais expressiva no parênquima paliçádico (Fig. 2B). Lipídios estruturais foram observados na epiderme, compondo a porção cutinizada da parede periclinal externa (Fig. 2A – 2C).

No caule os lipídios de reserva foram observados apenas em células da porção externa do córtex (Fig. 2G) e lipídios estruturais na epiderme, exclusivamente na parede periclinal externa (Fig. 2D, 2F e 2G). Na endoderme a análise revelou a presença de lipídios estruturais em todas as paredes celulares (Fig. 2E e 2H). Sob microscopia de fluorescência foi observado a presença de estrias de Caspary com composição lipídica na endoderme (Fig. 2I).

Dentre os reagentes utilizados para a identificação de substâncias lipídicas, a demonstração mais clara da ocorrência dos lipídios de reserva e estrutural em

microscopia de campo claro foi obtida com a aplicação do sudan III e sudan red 7B, e o vermelho neutro para microscopia de fluorescência.

Embora essenciais para a germinação e processos metabólicos, lipídios de reserva e estruturais não foram observados em *Bathysa cuspidata*, com a utilização de sudan IV e sulfato azul do nilo nos tecidos vegetais analisados (COELHO et al., 2012). Nos tecidos foliares de *Strychnos pseudoquina*, utilizando sudan III também não foi reportado a presença de lipídios. Já em *Psychotria fractistipula* os lipídios estruturais foram observados na superfície da folha, quando submetidos a reações com sudan III (OLIVEIRA, 2015).

A síntese dessas substâncias ocorre no retículo endoplasmático das células, que possuem enzimas específicas para a biossíntese (MURPHY; VANCE, 1999; TAIZ; ZEIGUER, 2013). Encontram-se distribuídos sobre todo o citoplasma em pequenas organelas compartimentadas, em tamanhos variáveis, desde 0,5 a 1,5 μm (CORTE et al., 2009) e delimitado por uma camada superficial contínua de proteínas anfipáticas (MURPHY; VANCE, 1999).

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias com estruturas simples até moléculas com alto grau de polimerização, contendo anel aromático, ao qual um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (ANGELO; JORGE, 2007; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Possuem uma variedade de funções nos vegetais, devido à sua grande diversidade química, dentre elas defesa contra herbívoros e patógenos, atração de polinizadores, proteção ao excesso de radiação UV-B às células, além de serem relatados como poderosos antioxidantes naturais (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; TAIZ; ZEIGUER, 2013).

Em *R. brasiliensis* os compostos fenólicos foram observados na epiderme das folhas e caules (Fig. 4A, 4B e 4E), nos vacúolos e em paredes celulares, em pequeno número de células em ambos os órgãos.

Nas folhas houve reação positiva em tricomas, incluindo células do pedestal (Fig. 4C e 4D). Nos caules, os compostos fenólicos também foram registrados nas

paredes celulares de células endodérmicas, com reação importante nas paredes tangenciais internas (Fig. 4F).

As reações observadas para os compostos fenólicos, foram positivas somente com a utilização do reagente dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e apresentaram coloração marrom avermelhada devido a condensação entre as hidroxilas livres com o crômio da mistura (FIGUEIREDO et al., 2007).

Os tecidos analisados nas folhas e caules não apresentaram coloração com o reagente cloreto férrico ($FeCl_3$) o que pode ser explicado pela falta de especificidade quando se utilizam íons ferro, pois a reação depende da hidroxilação, do grau de polimerização das moléculas (ANGELO; JORGE, 2007) e da complexação entre orto-dihidroxifenóis e o Fe^{3+} para formarem precipitados de coloração que varia do verde intenso à azul negro (FIGUEIREDO et al., 2007). Entretanto analisando folhas e cascas de caules de *Bathysa cuspidata*, Rubiaceae, utilizando os reagentes $K_2Cr_2O_7$ e $FeCl_3$ houve reações positivas para compostos fenólicos com coloração marrom avermelhada e preta respectivamente (COELHO et al., 2012).

Os compostos fenólicos de modo geral são pouco específicos, como os flavonoides que, devido a labilidade, muitas vezes não são detectados em microscopia de luz branca, somente por meio de microscopia de fluorescência (SANTOS et al., 2006).

A utilização de mais de um reagente é importante, pois muitas vezes não há reação entre as substâncias analisadas, pela falta de especificidade do reagente, como reportado por Karabourniotis et al. (2001), quando utilizou o floroglucinol-HCl, não houve fluorescência nas células guardas, não confirmando a presença de lignina a qual foi observada com hidróxido de potássio (KOH).

As estruturas de células lignificadas foram registrados no xilema secundário do caule de *R. brasiliensis* com o uso do azul de toluidina (Fig. 1A). Os cortes do caule em contato com solução de KOH, observados em microscopia de fluorescência demonstraram a presença de lignina nas paredes celulares (Fig. 4F).

A lignina apresenta forte fluorescência azul sob excitação UV e se transforma esverdeada com a adição de um álcali (ROST 1995 apud KARABOURNIOTIS et al., 2001), porém nas análises de *R. brasiliensis* não houve esta observação da coloração verde.

A lignina é uma macromolécula altamente complexa, encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecidos, principalmente de sustentação e vascular, e

juntamente com os taninos são polímeros fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos (ANGELO; JORGE, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Flavonoides

Em diferentes tecidos das folhas e caules de *R. brasiliensis* por meio do cloreto de alumínio (AlCl_3) não foi observada a coloração amarelo-esverdeado (JOHANSEN, 1940) indicativa de flavonoides, o que se pode atribuir a especificidade do reativo. No entanto nos caules não submetidos a reagentes químico, foram observadas no córtex externo, imediatamente abaixo da epiderme células coradas indicativas de antocianinas (Fig. 1B e 1C). As antocianinas fazem parte da classe dos flavonoides, e são pigmentos naturais responsáveis por uma variedade de cores atrativas das frutas, flores e folhas, que variam do vermelho ao azul (SANTOS et al., 2014). Esses pigmentos são encontrados em diversas famílias vegetais, dispersos nos vacúolos celulares, principalmente em órgãos como raízes e folhas.

Em *Cuphea carthagenensis*, pigmentação avermelhada foi observada no caule e em parte da epiderme foliar, sugerindo que essas substâncias são antocianinas resultante do processamento metabólico de proantocianidinas junto com a moléculas de açúcar e ácidos (LUSA; BONA, 2011).

Compostos flavônicos em *R. brasiliensis* foram identificados por diversos autores (PINTO, 2008; PINTO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2009; MORAIS et al., 2013) e o ácido clorogênico e a rutina foram identificados e quantificado nos extratos brutos das diferentes estações na espécie (DORNELLES et al. 2015, não publicado).

É possível observar que em análises histoquímicas realizadas nas folhas e cascas do caule de *B. cuspidata*, reações com AlCl_3 também foram negativas, no entanto em análises cromatográficas a presença de flavonoides foi detectada (COELHO et al. 2012).

O tempo de reação necessário para que ocorra o complexo flavonoide-alumínio III e o tipo de flavonoide são importantes na formação da estabilidade deste complexo, que ocorre com as hidroxilas livres dos flavonoides, ocasionando um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (MARQUES et

al., 2012), esses fatores podem explicar a não observação de flavonoides em cortes histológicos.

As cumarinas são lactonas do ácido-orto-hidróxi-cinâmico que em meio alcalino, apresenta fluorescência azul ou verde, pois ocorre a abertura do anel (COSTA, 1982; KUSTER; ROCHA, 2007). Os flavonoides possuem uma estrutura com dois anéis fenólicos que solubilizados em hidróxidos alcalinos resultam em soluções coradas de amarelo permitindo a diferenciação dos compostos.

As análises dos tecidos, em folhas e caules de *R. brasiliensis*, com soluções alcalinas mostraram fluorescência amarela. As folhas apresentaram fluorescência em ambas as faces do tecido epidérmico (Fig. 5C e 5D) e algumas células do mesofilo (Fig. 5C), e nos caules, as células do córtex, principalmente córtex externo e endoderme (Fig. 5E e 5F), e região medular, principalmente nas células junto ao xilema (Fig. 5F).

Com base em estudos realizados anteriormente em *R. brasiliensis*, tanto flavonoides quanto cumarinas foram identificados e isolados, sendo que a presença de ambas substâncias foi confirmada nos extratos brutos e frações (PINTO, 2008; PINTO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2009; MORAIS et al., 2013; DORNELLES et al. 2015, não publicado). Assim, a coloração resultante, observada sob microscopia de fluorescência nos cortes de *R. brasiliensis* não pode ser conclusivo quanto ao grupo químico.

Taninos

Os taninos são substâncias com características adstringentes, alto peso molecular e capacidade de precipitar celulose, pectinas e proteínas (SANTOS e MELLO, 2007) e estão relacionados principalmente com a defesa do vegetal, contra a herbivoria e como repelente alimentar.

A partir de reações de caracterização em *R. brasiliensis*, foi observado coloração do castanho ao verde, indicativo da presença de taninos condensados e por cromatografia em camada delgada (CCD) o extrato bruto e a fração hexânica apresentaram manchas com coloração castanho esverdeado e Rf de 0,86 e 0,93. A fração acetato de etila apresentou três manchas levemente azuladas (0,42; 0,55; 0,61) indicativa de tanino hidrolisável. Na histoquímica não foi observada coloração

característica de taninos, o que pode estar relacionado com a concentração destas substâncias, que em outros métodos como CCD são mais sensíveis mesmo em baixa concentração (COELHO et al., 2012).

Alcaloides

Na literatura há relato que Rubiaceae é uma das três famílias da ordem Gentianales no qual ocorre a presença de alcaloides indólicos, sendo rara sua presença em outras ordens (BOTH, 2005; SCHRIPEMA; DAGNINO; GOSMANN, 2007).

Os alcaloides formam sais complexos com compostos de mercúrio e outros metais, normalmente na forma de precipitado, indicando sua presença (RINNERT, 2010).

A análise histoquímica com o reagente de Wagner, demonstrou a presença de alcaloides em células do periciclo, em inclusões de tamanhos variáveis tanto no caule quanto na folha (Fig. 6A e 6B). Algumas células do córtex (Fig. 6C, 6D e 6F) e na região medular (Fig. 6E), mostraram inclusões com padrão de coloração similar.

Alcaloides foram detectados em diferentes células e tecidos de *Cannabis sativa* por Furr e Mahlberg (1981), que também identificou a presença de cannabinoide. A diferença na distribuição de alcaloides ocorre por estes serem sintetizados em uma região e acumulados em outra, de acordo com o desenvolvimento da planta.

Laus, Brossner e Keplinger (1997), estudando *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae), em diferentes fases de maturação e variações sazonais relacionou a síntese e acúmulo de alcaloides como Furr e Mahlberg (1981).

CONCLUSÕES

No estudo histoquímico com *Richardia brasiliensis* foi possível comprovar a presença de lipídios de reserva e estruturais, tanto nas folhas quanto nos caules evidenciando a localização de metabólitos nos diferentes órgãos analisados.

Os lipídios foram observados com maior clareza a partir dos reativos sudan III e sudan red 7B em microscopia de campo claro e o vermelho neutro em microscopia de fluorescência.

A presença de compostos fenólicos, antocianina e alcaloides foram bem caracterizados nas folhas e caules.

Flavonoides e cumarinas não puderam ser definidas com as análises histoquímicas.

Flavonoides e cumarinas foram bem caracterizados a partir de reações de caracterização e cromatografia.

REFERÊNCIAS

ALLEN, D. K.; BATES, P. D.; TJELLSTRÖM, H. Tracking the metabolic pulse of plant lipid production with isotopic labeling and flux analyses: past, presente and future. **Progress in Lipid Research**, v. 58, p.97-120, 2015.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenolicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

BOTH, F. L. **Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotatina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. 2005. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BRUNDRETT, M. C.; KENDRICK B.; PETERSON, C. A. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. **Biotechnic & Histochemistry**, v.66, p.111-116, 1991.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007. c.20, p.519.

CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta**, v.129, p.167-174, 1976.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânicos das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.170-177, 2006.

COELHO, V. P. M. et al. Anatomy, histochemistry and phytochemical profile of leaf and stem bark of *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae). **Australian Journal of Botany**, v.60, p.49-60, 2012.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1982, 1032p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5.ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, 1031p.

DAVI, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpenique des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris**, v.258, p.1338-1340. 1964.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. Brasília: 2010. pt.1, p.192-204.

FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos**. 1. ed. Lisboa. 2007. 80p.

FIGUEIREDO, A. D. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p.193-196, 2009.

FILHO, S. C. V. **Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici (*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. ex Juss)**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

FURR, Y.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v.44, p.153-159, 1981.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson e Cie, 1968. 1113 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw- Hill, 1940. 523 p.

KARABOURNIOTIS, G. et al. Epicuticular phenolics over guard cells: exploitation for in situ stomatal counting by fluorescence microscopy and combined image analysis. **Annals of Botany**, v.87, p.631-639, 2001.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007. c.21, p537.

LAUS, G.; BROSSNER, D.; KEPLINGER, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p.855-860, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2º ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUSA, M. G.; BONA, C. Caracterização morfoanatómica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. (Lythraceae). **Acta Botânica Brasileira**, v.25, n.2, p.517-527, 2011.

KIRK, P. W. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology**, v.45, p.1-4, 1970.

MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v.52, p.2423-2426, 1974.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v.35, n.3, p.517-522, 2012.

MENDONÇA, A. C. A. et al. Rubiaceae: aspectos ecológicos e reprodutivos. **Caderno de Cultura e Ciências**, v.12, n.2, p.8-20, 2013.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. Lípidos: química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007. c.17, p.435.

MORAIS, E. C. et al. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v.12, n.4, p.619-622, 2013.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n.1, p.13-39, 1979.

MURPHY, D. J.; VANCE, J. Mechanisms of lipid-body formation. **Trends in Biochemical Sciences**, v.24, p.109-115, 1999.

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcaphy Pty, 1981. 342 p.

OLIVEIRA, C. F. **Morfoanatomia, caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (Rubiaceae)**. 2015. 104 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and applied**. 4.ed. Longman Group Limited, 1980.

PINTO, D. S. et al. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

PINTO, D. S. **Primeiros estudos quimiotaxonômicos do gênero *Richardia*: fitoquímica da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2008. 145 f. Dissertação (Mestrado em) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

RINNERT, C. H. **Análise estrutural de folhas de *Senna multijuga* sunsp. *Lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinoideae) e localização *in situ* de compostos com ação biológica de interesse farmacológico**. 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.

ROCHA, F. A. G. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v.1, p.1-13, 2015.

ROSSETO, R.; PITELLI, R.M.; PITELLI, R.A. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: Poaia-Branca. **Planta Daninha**, v.15, n.1, 1997.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. S. et al. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**. v.30, n.3, p.481-489, 2006.

SANTOS, A. C. A. et al. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. **Revista Interdisciplinar**, v.7, n.3, p.149-156, 2014.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007. c.24, p.615.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcaloides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007. c.31, p.819.

SOUZA, F. H. T. et al. Nova cumarina isolada de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Fortaleza, **Anais**, 2009.

SOUZA, F. H. T. **Estudos fitoquímicos e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 194 f. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

SVENDSEN A. B.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids**. Elsevier Scientific Publishing Company, New York. 1983. 503 p.

TAIZ, L.; ZEIGUER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p.719.

VENTRELLA, M. C. et al. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Série conhecimentos. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal. 2013. 40p.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007. c.23, p.577.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2.ed. Alemanha, 1996. 384p.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1.ed. Chapecó: Editora Argos, 2001. 523p.

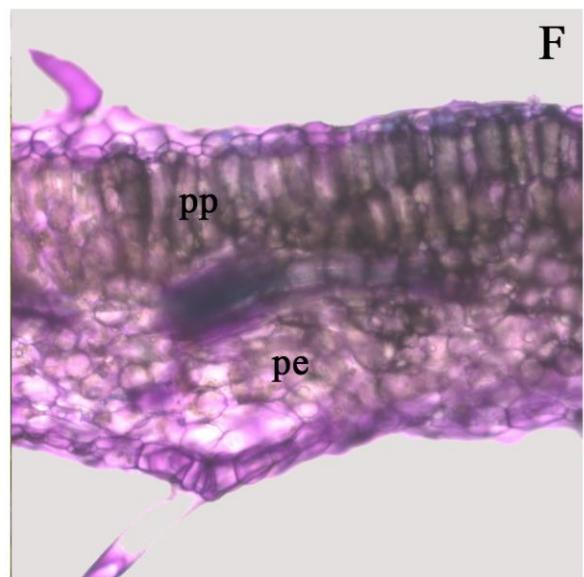
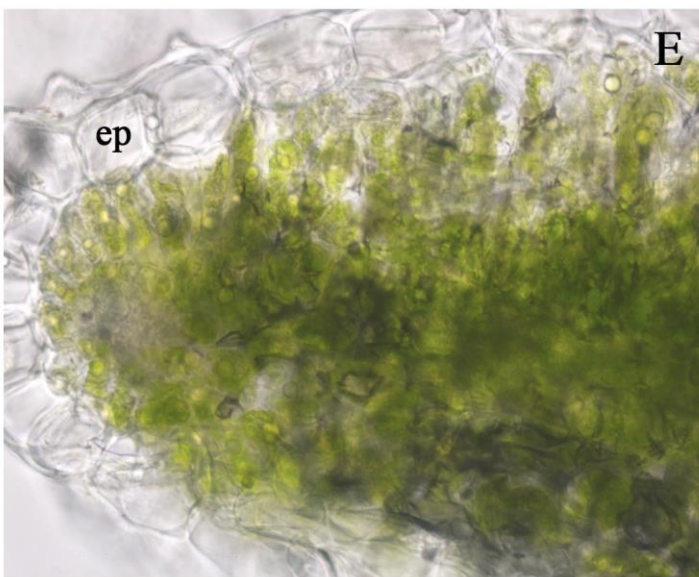
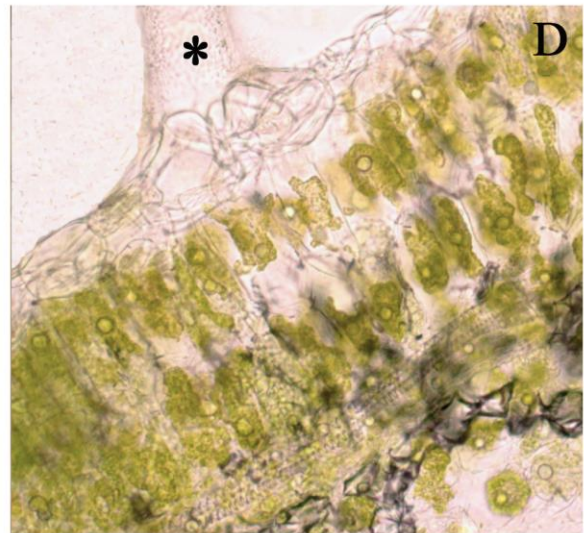
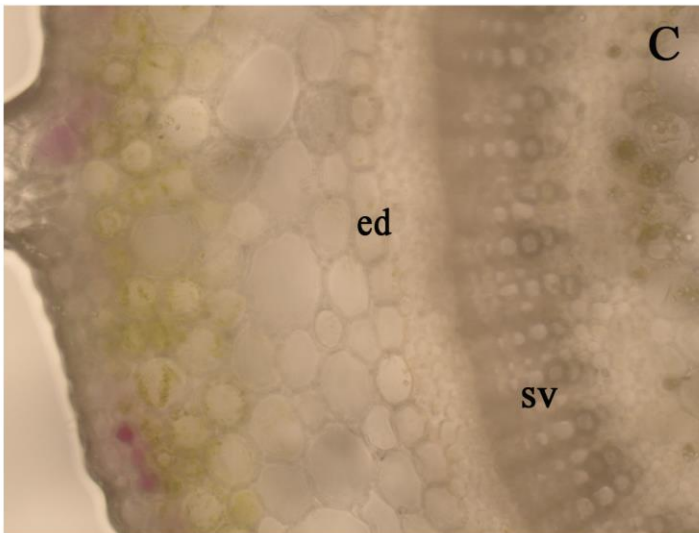
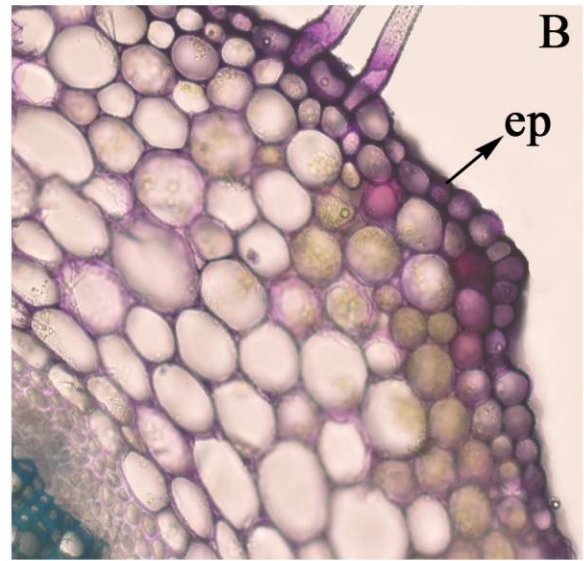
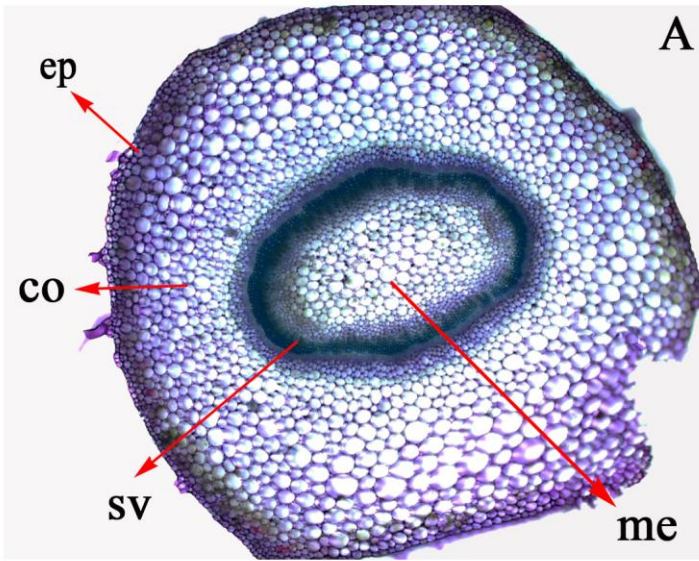


Figura 1 - Anatomia geral do caule (Fig. 1A a 1C) e folha (Fig. 1D a 1F) de *Richardia brasiliensis* Gomes. Cortes transversais, à mão livre. Fig. 1A Aspecto geral do caule, corado com azul de toluidina. Microscopia de campo claro. Fig. 1B Epiderme simples e presença de antocianinas na região externa do córtex, corado com azul de toluidina. Microscopia de campo claro. Fig. 1C Epiderme simples do caule, sem a presença de corante, evidenciado a presença de antocianinas. Microscopia de campo claro. Fig. 1D e 1E Seção transversal da lamina foliar, demonstrando a epiderme simples, mesofilo foliar e tricomas tectores. Sem a presença de corante. Microscopia de campo claro. Fig. 1F Seção transversal da lamina foliar, corado com azul de toluidina. Microscopia de campo claro. (ep) Epiderme simples. (co) Cortex. (sv) Sistema vascular. (me) Medula. (ed) Endoderme. (pp) Parênquima paliçádico. (pe) Parênquima esponjoso. (*) Tricoma tector.

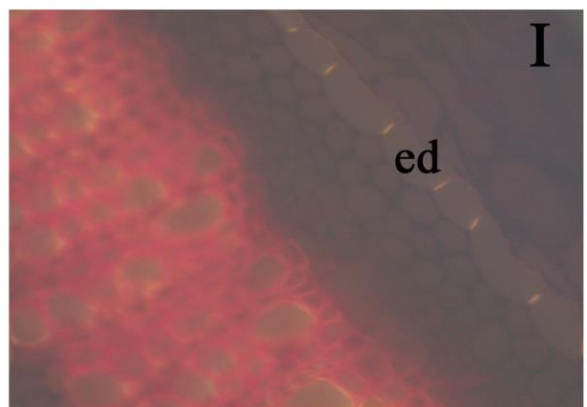
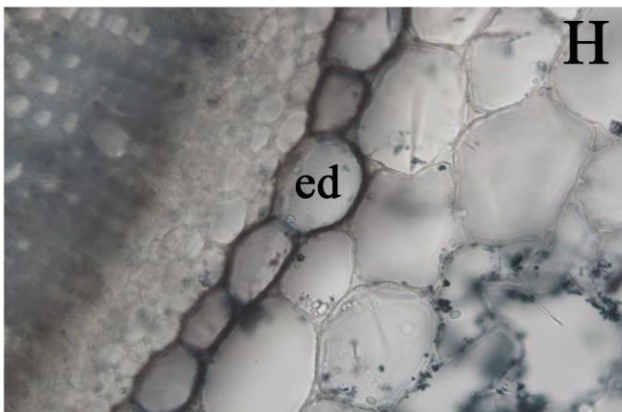
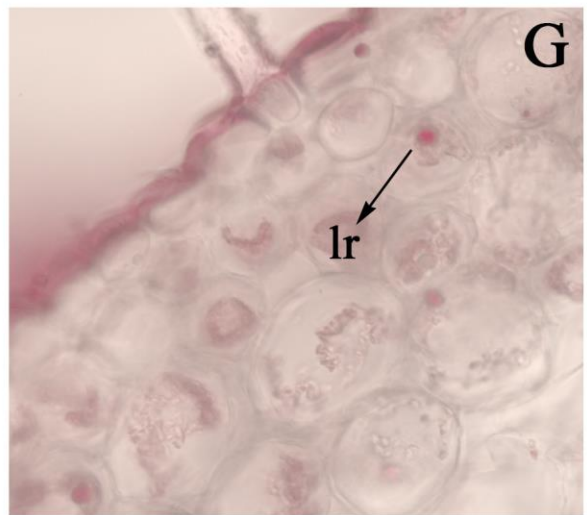
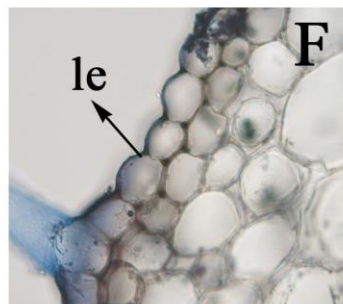
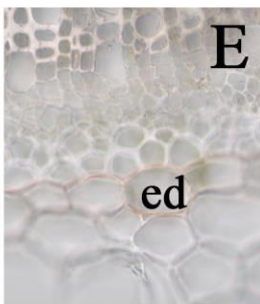
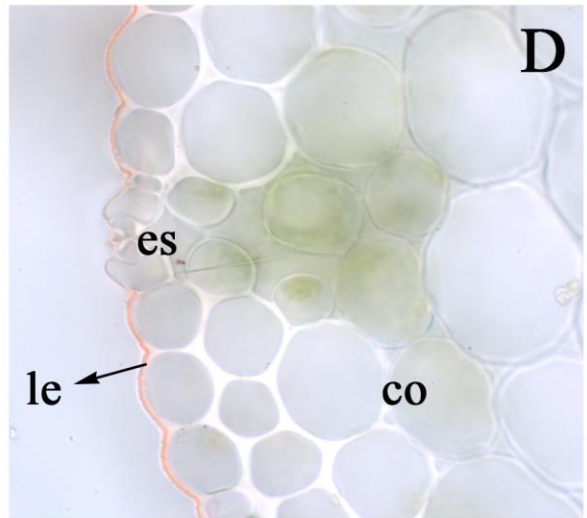
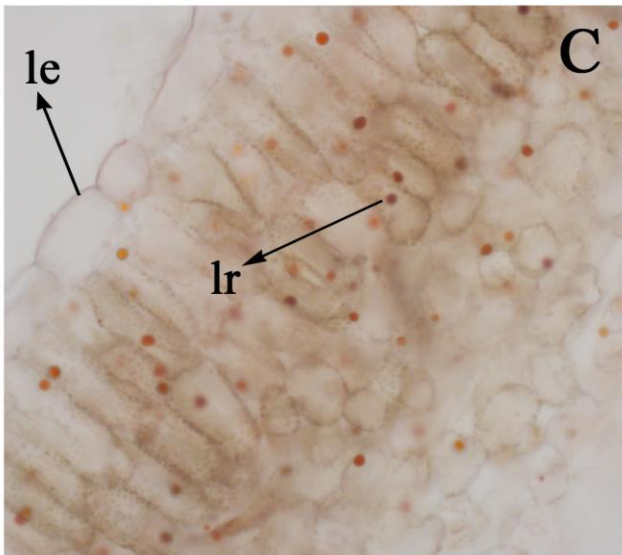
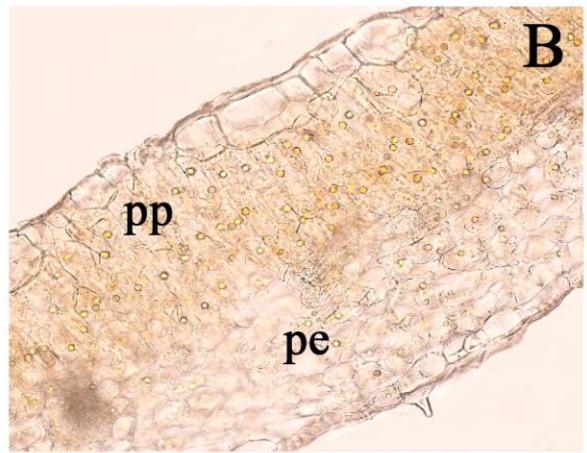
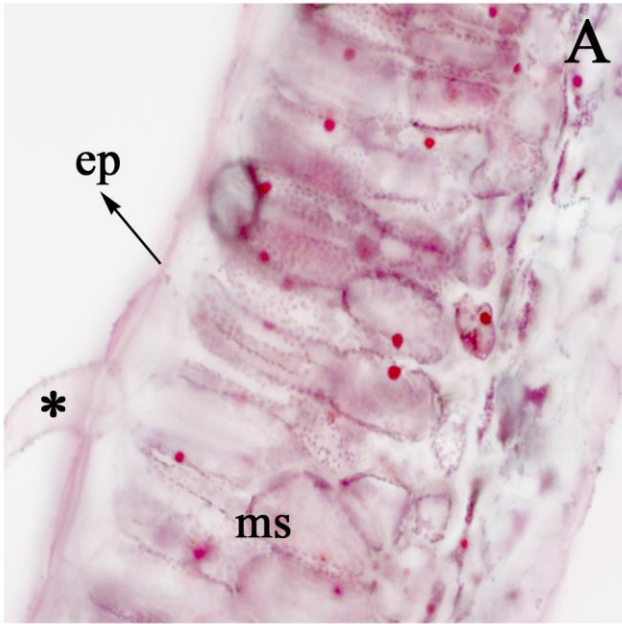


Figura 2 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 2A a 2C) e caule (Fig. 2D a 2I) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 2A Lipídios de reserva no mesofilo e lipídios estruturais na epiderme. Corado com sudan red 7B. Microscopia de campo claro. Fig. 2B e 2C presença de lipídios de reserva, corados com sudan III. Microscopia de campo claro. Fig. 2D e 2E Presença de lipídios estruturais na porção cutinizada da epiderme e na endoderme, respectivamente, corados com sudan III. Microscopia de campo claro. Fig. 2F e 2H Detalhe dos lipídios estruturais na porção externa da epiderme e em toda a parede da endoderme, corados com sudan black B. Microscopia de campo claro. Fig. 2G, corado com sudan red 7B, demonstrando a presença de lipídios estruturais e de reserva na porção externa do córtex. Microscopia de campo claro. Fig. 2I Caracterizando a presença de lipídios estruturais nas estrias de Caspary, presente na endoderme. Corado com Vermelho Neutro. Microscopia de fluorescência. (ep) Epiderme simples. (ms) Mesofilo. (*) Tricoma tector. (pp) Parênquima paliçádico. (pe) Parênquima esponjoso. (le) Lipídio estrutural. (lr) Lipídio de reserva. (es) Estômato. (co) Cortex. (ed) Endoderme.

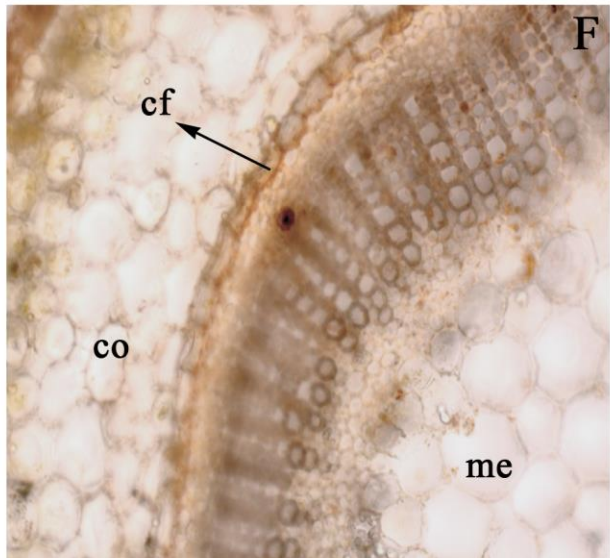
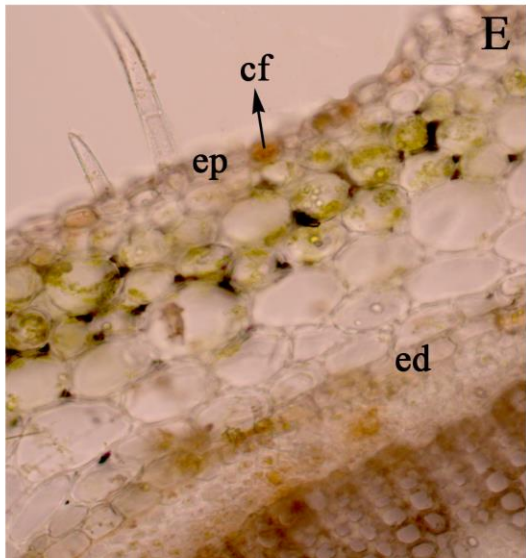
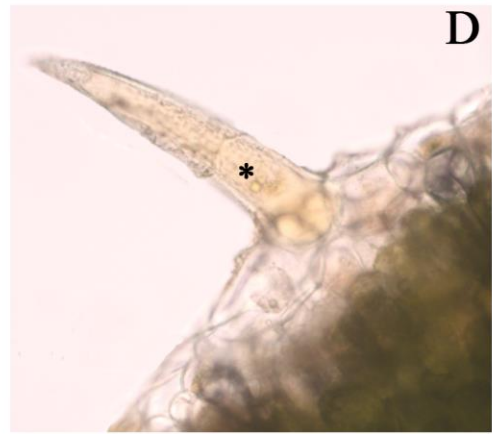
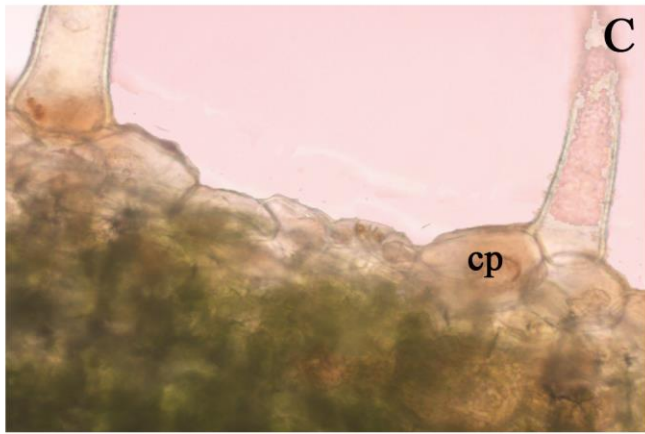
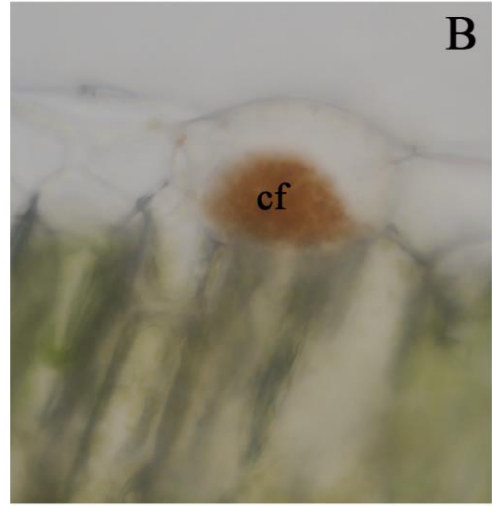
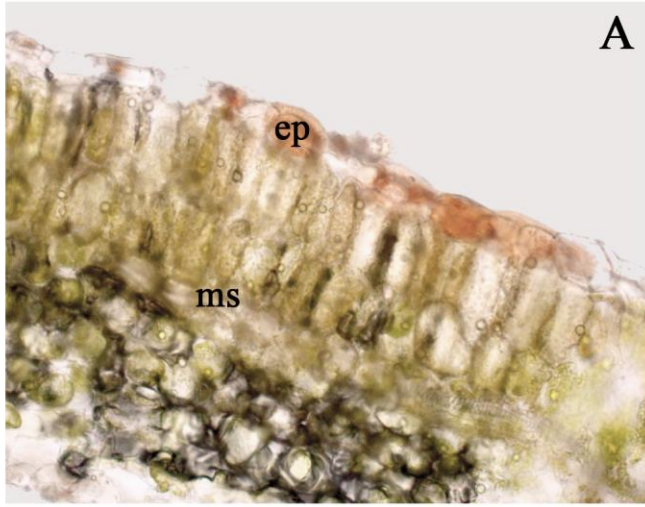


Figura 3 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 3A a 3D) e caule (Fig. 3E a 3F) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 3A Presença de compostos fenólicos na epiderme da folha. Fig. 3B Detalhe da presença de compostos fenólicos na epiderme simples da folha. Figs. 3C e 3D Detalhe da presença de substâncias fenólicas nos tricomas e células do pedestal. Fig. 3E Compostos fenólicos nas células da epiderme do caule. Fig. 3F Presença de compostos fenólicos nas paredes tangenciais internas da endoderme. Cortes corados com dicromato de potássio, observados em microscopia de campo claro. (ep) Epiderme simples. (ms) Mesofilo. (cf) Compostos fenólicos. (cp) Células do pedestal. (*) Tricoma tector. (ed) Endoderme. (co) Córtex. (me) Medula.

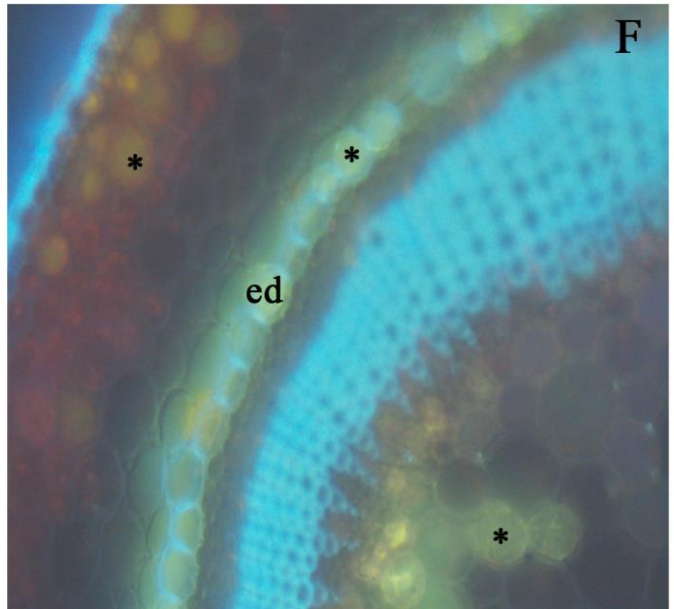
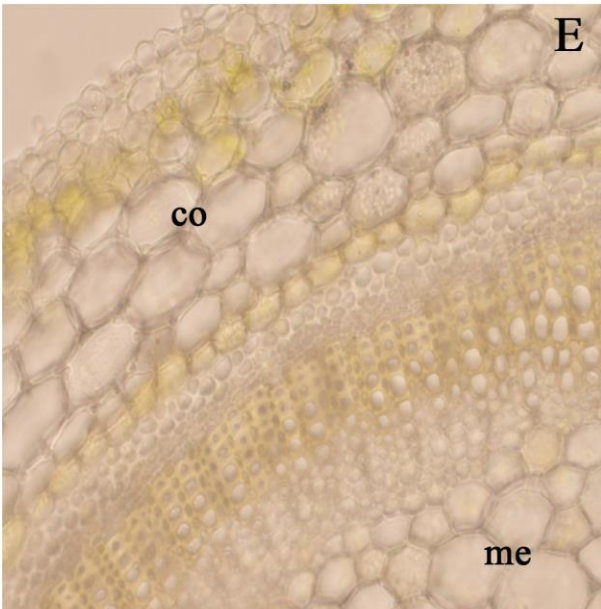
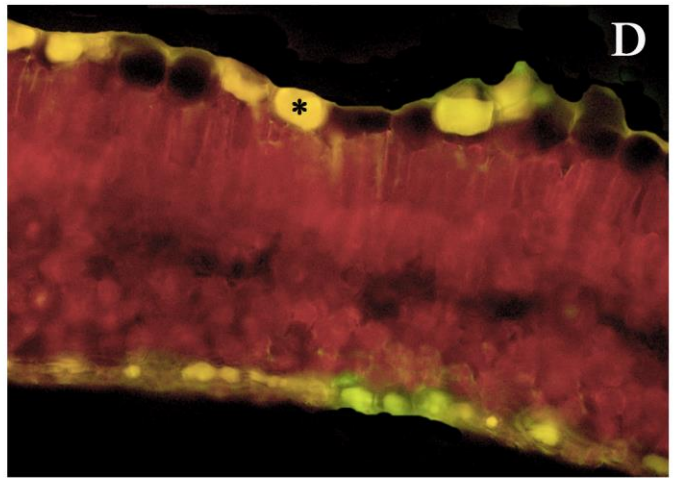
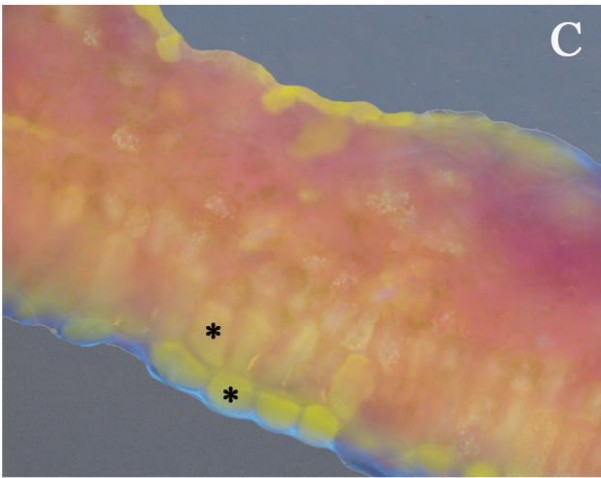
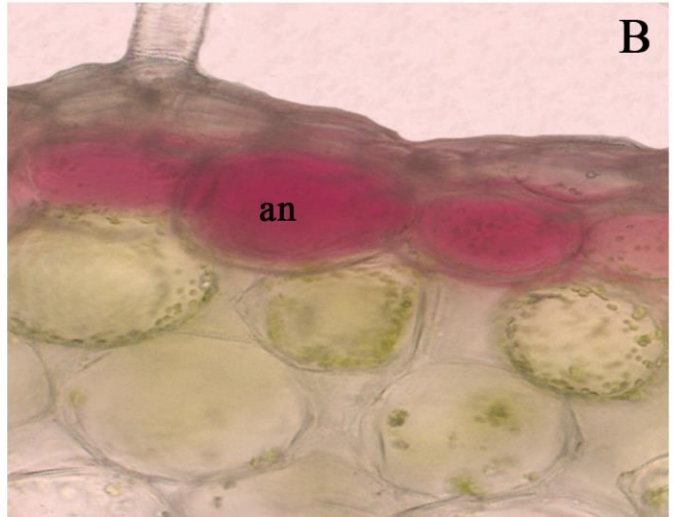


Figura 4 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 4A, 4C e 4D) e caule (4B, 4E a 4F) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 4A Corte histológico da folha submetido ao contato com solução alcalina de NaOH, apresentando substâncias amareladas e laranjas, vista sob microscopia de campo claro combinado com fluorescência. Fig. 4B Presença de antocianinas na epiderme do caule, sem a utilização de corante. Microscopia de campo claro. Fig. 4C e 4D Cortes submetidos a solução de NaOH mostrando detalhes da presença de substâncias amarelas na epiderme e em células do mesofilo, observadas em microscopia de fluorescência. Fig. 4E Corte histológico do caule, observado em campo claro, submetido ao contato com NaOH, com a presença de substâncias amarelas. Fig. 4F Corte de caule, submetido ao contato com solução de KOH, apresentando substâncias amarelas no córtex, endoderme e região medular, observado em microscopia de fluorescência. (an) Antocianinas. (*) Substâncias amarelas fluorescentes. (co) Córtex. (me) Medula. (ed) Endoderme.

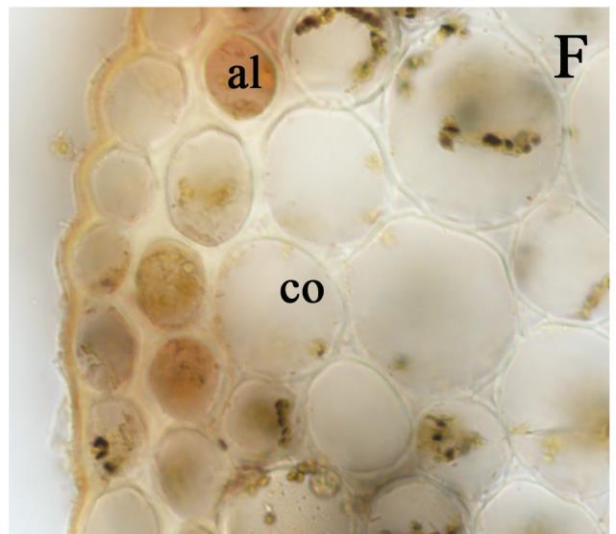
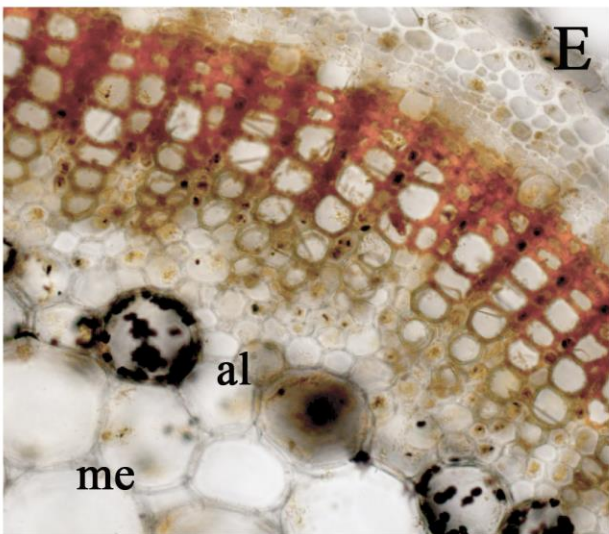
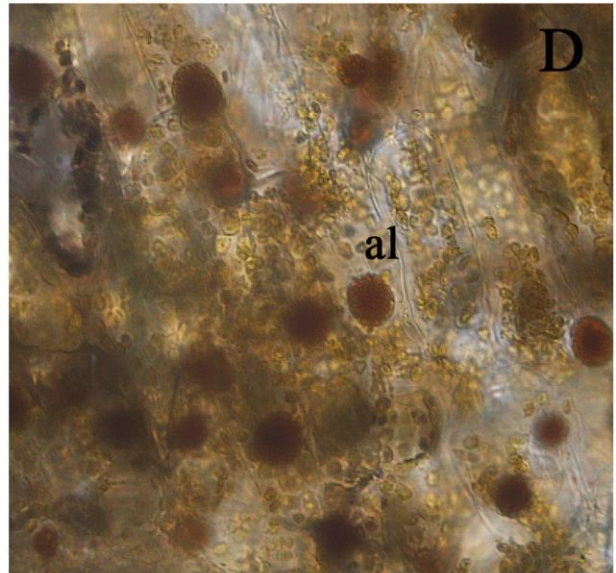
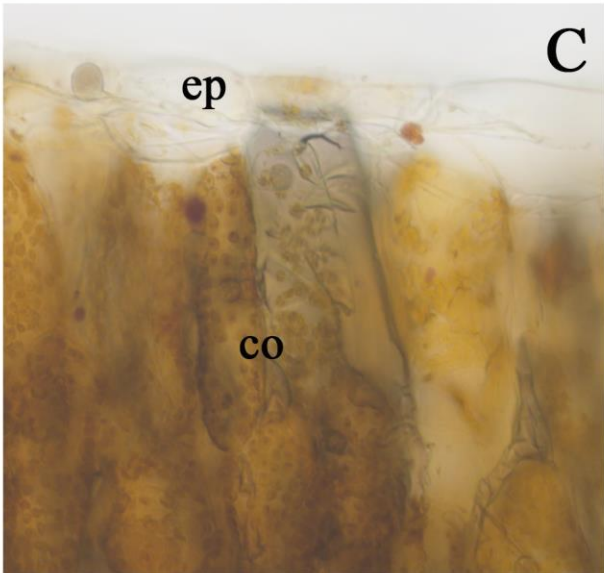
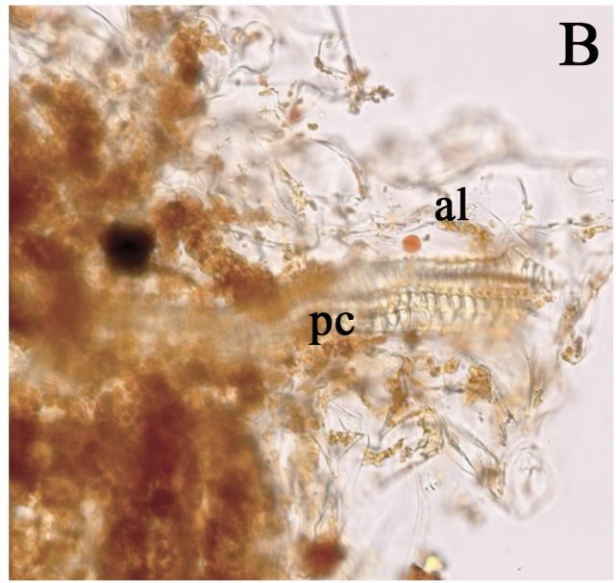
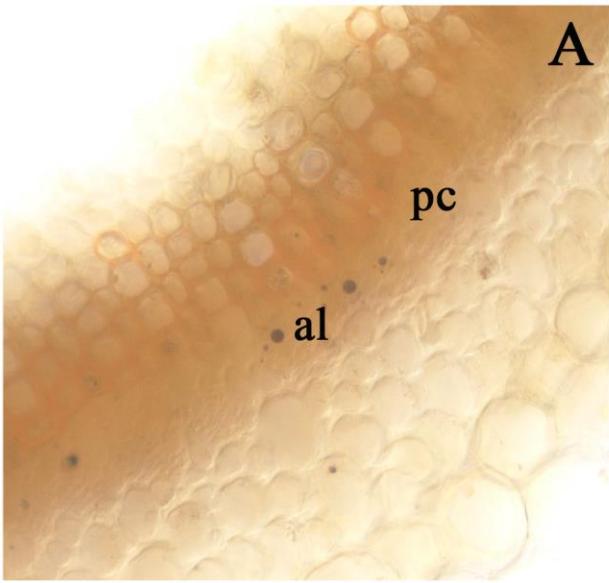


Figura 5 - Cortes transversais, à mão livre das folhas (Fig. 5B a 5D) e caule (Fig. 5A, 5E e 5F) de *Richardia brasiliensis*. Fig. 5A Presença de substâncias alcaloídicas no periciclo do caule. Fig. 5B Alcaloides no periciclo da folha. Fig. 5C e 5D Detalhe da presença de alcaloides na região externa do córtex da folha. Fig. 5E Presença de alcaloides na região medular do caule. Fig. 5F Presença de alcaloides na região do córtex do caule. Cortes corados com reagente de Wagner, observados em microscopia de campo claro. (pc) Periciclo. (al) Alcaloides. (ep) Epiderme simples. (co) Córtex. (me) Medula.

Potencial Antiproliferativo e Genotóxico dos Extratos e Frações de *Richardia brasiliensis* GOMES pelo sistema Teste de *Allium cepa*

DORNELLES, R. C.^{1,2}; LEAL, G. C.²; DECIAN, A. C. S.²; SANTOS, D. D.¹; RADISKE, G. A.²; CUELHO, C. H. F.²; MANFRON, M. P.^{1,2}; TEDESCO, S. B.¹.

¹Departamento de Biologia;

²Departamento de Farmácia Industrial;

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

RESUMO

Os produtos naturais são utilizados com os mais diversos fins pelos povos ao longo dos séculos. Além da utilização popular, atualmente grande parte dos fármacos utilizados é proveniente de fontes naturais ou semi-sintetizados a partir destas e cada vez mais se busca novos compostos com ação terapêutica nos vegetais. A espécie medicinal *Richardia brasiliensis* Gomes pertencente à família Rubiaceae, possui metabólitos secundários com atividades farmacológicas consideráveis, sendo utilizada no tratamento do diabetes, hemorróidas, como anti-helmíntico, antiemética e em doenças na pele. Para determinar a capacidade antiproliferativa e genotóxica da espécie, foi utilizado o teste em *Allium cepa*, pelo qual se pode detectar danos nos cromossomos e a influencia na proliferação celular durante o ciclo mitótico. O efeito antiproliferativo e genotóxico dos extratos obtidos em diferentes estações do ano e frações de *R. brasiliensis* foram avaliados nas concentrações de 10 e 500 µg/mL, perfazendo um total de dezenove tratamentos. Foram analisadas 4000 células por tratamento, sendo que os índices mitóticos (IM) e a porcentagem de células com alterações foram calculados e utilizado o teste do Qui-quadrado para a análise estatística. Os extratos e frações de *R. brasiliensis* possuem capacidade antiproliferativa, destacando o extrato bruto de outono e a fração butanólica na concentração de 500 µg/mL com IM inferior ao controle negativo. Todos os tratamentos foram genotóxicos apresentando alterações cromossômicas, porém com valores inferiores e estatisticamente diferentes aos encontrados no controle positivo.

Palavras-chave: Poaia branca. Índice mitótico. *Allium cepa*. Genotoxicidade. Ciclo celular.

INTRODUÇÃO

A espécie *Richardia brasiliensis* Gomes é uma planta nativa de hábitos herbáceos, conhecida por poaia-branca, ervaço ou ipeca, pertencente à família Rubiaceae, encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, possui vasta distribuição, principalmente em regiões com intensa atividade agrícola, como as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (FIGUEIREDO et al., 2009).

É utilizada na medicina popular como antiemética, antidiabética, anti-hemorroidal, vermífuga e em doenças na pele (PINTO et al., 2008; SOUZA et al., 2009) e o decocto das raízes é utilizado como expectorante e diaforético (GRANDI et al., 1989). Além disso, há relatos científicos da utilização de extratos e frações da espécie, como antibacteriana frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Há também indicações do uso da planta pela população no tratamento de doenças na pele, tais como eczemas, queimaduras e até mesmo câncer e essa ação farmacológica não pode ser descartada, já que em *R. brasiliensis* foram identificados alguns constituintes químicos com ação antitumoral, tais como substâncias polifenólicas e alcaloídicas (UNNATI et al., 2013).

A utilização da espécie no tratamento e cura de doenças pode ser justificada devido à presença de compostos ativos como flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, resinas, ácidos orgânicos e compostos fenólicos encontrados nos extratos de *R. brasiliensis* (FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009), além de terem sido isolados metabólitos secundários como a escopolentina, uma cumarina, isorametina-3-O-rutinosídeo um flavonoide, ácido oleanólico, um triterpeno e ácidos orgânicos como o ácido p-hidroxibenzoico e ácido m-metoxi-p-hidroxibenzoico (PINTO et al., 2008).

Para a comprovação da utilização de uma planta como medicinal, ou mesmo a produção de um fitoterápico, é necessário haver respostas positivas a ensaios que comprovem as propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas e também determinar o grau de toxicidade nas doses compatíveis com seu emprego medicinal (LORENZI; MATOS, 2008). Portanto, é importante elucidar os compostos ativos presentes nas plantas utilizadas medicinalmente bem

como seus mecanismos de ação através de bioensaios que detectam efeitos específicos (MACIEL et al., 2002).

Estudos da toxicidade e de mutagenicidade de produtos naturais são necessários para uma utilização segura e eficaz de um agente terapêutico (MARSIGLIA et al., 2011). Grande parte das substâncias proveniente do metabolismo vegetal, demonstram possuir efeitos terapêuticos, podendo atuar como antitumorais afetando diferentes alvos e transduções de sinais que modulam a expressão de genes e conseqüentemente a progressão do ciclo celular, a proliferação e mortalidade celular (HEMALSWARYA; DOBLE, 2006).

Dentre os métodos disponíveis para a avaliação de alterações celulares, o ensaio com *Allium cepa* L., fornece resultados satisfatórios para a avaliação de efeitos antiproliferativos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias, sendo considerado como um organismo padrão para testes rápidos e apresentando correlação positiva com outros sistemas testes (CHAUAN; SAXENA; GUPTA, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2006).

A ação antiproliferativa e conseqüentes alterações cromossômicas podem ser visualizadas durante o ciclo celular de *A. cepa*, evidenciando a mutagenicidade de determinada substância. As principais anormalidades cromossômicas encontradas são anáfases e metáfases irregulares, células binucleadas e células aderentes, quebras cromossômicas, pontes e cromossomos perdidos ou retardatários (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). A partir da observação das células meristemáticas, é possível determinar o índice mitótico (IM), utilizado como indicador da proliferação das células, o qual é obtido através do número de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase dividido pelo número total de células observadas (VIEIRA et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo e genotóxico dos extratos e frações de *R. brasiliensis*, em diferentes concentrações sobre o ciclo celular de *A. cepa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico

As partes aéreas de *Richardia brasiliensis* foram coletadas nas diferentes estações do ano, em Santa Maria, Rio Grande do Sul, no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (S29°43.277' W053°42.844'). Um exemplar da planta foi coletado e identificado pela Dr.^a Thais Scott do Canto-Dorow e o material testemunho depositado sob registro SMDB 13966, no herbário do Departamento de Biologia da UFSM.

Obtenção do extrato bruto e frações

O material botânico foi seco em estufa de ar circulante à temperatura de aproximadamente 40°C, após foi reduzido a pó, através de moinho de facas. Os extratos foram obtidos por maceração da droga em pó (300g) com renovação de solvente hidroetanólico a 70%, durante 30 dias, concentrado, liofilizado e calculado o rendimento.

O extrato bruto foi fracionado segundo Falkenberg et al. (2007), através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, iniciando com n-hexano (HEX), clorofórmio (CLO), acetato de etila (AcOET) e butanol (BUT), obtendo-se assim as frações semi-purificadas.

Efeito do extrato bruto e frações de *Richardia brasiliensis* sobre o ciclo celular de *Allium cepa*

Foram utilizados 19 tratamentos no total, sendo 16 tratamentos preparados nas concentrações de 10 e 500 µg/mL, utilizando o extrato bruto das quatro estações do ano e frações, todos solubilizados na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% e três controles.

Para o controle positivo foi utilizado o herbicida glifosato 1%, como controle negativo, água destilada e como controle do diluente, água e DMSO a 0,4%.

Os bulbos de *Allium cepa* foram colocados em frascos de 50 mL com água destilada para enraizar e após, nas soluções a serem analisadas por um período de 24 horas. A seguir as radículas foram coletadas, com aproximadamente 5 – 10 mm de comprimento e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas, mantidas em etanol 70% e conservadas sob refrigeração

Para o preparo das lâminas, as radículas foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1 N por 5 min, lavadas em água destilada e coradas comorceína acética 2%. A região meristemática foi esmagada com auxílio de um bastão de vidro e uma lamínula colocada sobre o material. As lâminas foram observadas e analisadas ao microscópio óptico com aumento de 40X. Foram utilizados 4 bulbos e contadas 1000 células, totalizando 4000 células em cada tratamento.

Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos no teste de *Allium cepa*, foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), com nível de probabilidade de erro $<0,05$ através do programa BioEstat 5.3 (AYRES, 2007).

RESULTADOS

O número total de células analisadas nos 19 tratamentos durante o ciclo celular nas radículas de *Allium cepa*, células observadas em interfase, células em fase de divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e os valores do índice mitótico (IM) são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos com extratos e frações de *Richardia brasiliensis*, controles, número total de células observadas nas diferentes fases do ciclo celular e determinação do índice mitótico (IM) no teste de *Allium cepa*.

Tratamentos (µg/mL)	Nº total de células observadas	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Índice mitótico (%)
T1: EB VERÃO – 500	4000	3653	198	53	39	57	8,67f
T2: EB VERÃO – 10	4000	3504	261	73	63	99	12,4b
T3: EB OUTONO – 500	4000	3783	100	42	29	46	5,42i
T4: EB OUTONO – 10	4000	3592	175	88	62	83	10,2e
T5: EB INVERNO – 500	4000	3602	127	109	44	118	9,95e
T6: EB INVERNO – 10	4000	3597	129	104	69	101	10,07e
T7: EB PRIMAVERA – 500	4000	3643	112	94	62	89	8,92f
T8: EB PRIMAVERA – 10	4000	3551	175	105	60	109	11,22c
T9: FRAÇÃO HEX – 500	4000	3717	111	68	34	70	7,07h
T10: FRAÇÃO HEX – 10	4000	3594	141	100	64	101	10,15e
T11: FRAÇÃO CLO - 500	4000	3442	193	135	82	148	13,95a
T12: FRAÇÃO CLO - 10	4000	3443	174	153	110	120	13,92a
T13: FRAÇÃO AcOET - 500	4000	3688	132	72	42	66	7,8g
T14: FRAÇÃO AcOET - 10	4000	3602	127	129	55	87	9,95e
T15: FRAÇÃO BUT - 500	4000	3730	129	59	38	44	6,75h
T16: FRAÇÃO BUT - 10	4000	3684	119	93	61	43	7,9g
T17: CONTROLE POSITIVO	4000	3693	160	63	16	68	7,67g
T18: CONTROLE NEGATIVO	4000	3570	227	67	60	76	10,75cd
T19: CONTROLE DO DILUENTE	4000	3583	184	110	41	82	10,42de

Médias seguidas de letras iguais, não diferem pelo teste de χ^2 em nível de 5% de probabilidade de erro. Controle positivo: glifosato 1%; controle negativo: água destilada; controle do diluente: água destilada + DMSO 0,4%.

O IM do controle positivo (7,67%), quando comparado com o controle negativo (10,75%) e com o controle do diluente (10,42%) foi significativamente menor, demonstrando que o glifosato a 1% inibe a divisão celular de radículas de *Allium cepa*. Souza et al. (2010), também registraram que o glifosato inibe as divisões celulares, quando estudaram a ação do extrato aquoso de *Artemisia verlotorum* sobre o sistema teste de *A. cepa*, porém o glifosato foi utilizado na concentração de 15%, demonstrando que independente da concentração testada, essa substância apresenta capacidade antiproliferativa.

O controle negativo e o controle do diluente não apresentaram diferença significativa no IM (10,75% e 10,42% respectivamente) demonstrando que a concentração de DMSO utilizada para solubilizar as amostras, não interferiu na proliferação celular.

O tratamento T3 no qual foi utilizado o extrato bruto de outono na concentração de 500 µg/mL, diferiu estatisticamente dos demais tratamentos apresentando o menor valor de IM (5,42%). Os tratamentos T9, fração hexânica e T15 fração butanólica, ambos na concentração de 500 µg/mL, apresentaram IM de 7,07 e 6,75% respectivamente, significativamente menor que o controle positivo (7,67%). Os tratamentos T1, T3, T4, T5, T6, T7, T9, T10, T13, T14, T15 e T16, apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo (água), porém com IM menor mostrando uma maior inibição no ciclo celular nestes tratamentos.

Os tratamentos T1, T2, T4, T5, T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14 e T16 tiveram IM maior que o controle positivo (7,67%), indicando que nesses tratamentos houve uma maior divisão das células do que no glifosato 1%. Os tratamentos T2, T8, T11 e T12 induziram a proliferação celular quando comparando ao controle negativo, na qual foi utilizada a água destilada.

Dentre os tratamentos e os controles, a fração clorofórmica, nas duas concentrações avaliadas (10 e 500 µg/mL) apresentou o maior índice de proliferação celular com IM de 13,92 e 13,95%, respectivamente.

Na menor concentração (10 µg/mL) houve aumento do IM, com exceção do tratamento T11 e T12, nos quais não houve diferença significativa entre eles.

Na observação das células foram visualizadas alterações ocasionadas pelos extratos, frações e controle positivo nos cromossomos, expressos na tabela 2.

Tabela 2 - Total de células observadas nas diferentes fases do ciclo celular com alterações cromossômicas (Ac).

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Nº total de células observadas com alterações	Nº total de células em divisão	Nº total de células observadas	Células com Ac (%)
T1: EB VERÃO – 500	1B	24D	1Q	3Q,1P	0	30	347	4000	0,75c
T2: EB VERÃO – 10	2M	0	5Q	4Q,5P	0	16	496	4000	0,40j
T3: EB OUTONO – 500	2B	1D	0	1P	0	4	217	4000	0,10n
T4: EB OUTONO - 10	0	14D	2Q	3P	0	19	408	4000	0,47i
T5: EB INVERNO – 500	1B	24D	0	1Q	0	26	398	4000	0,65f
T6: EB INVERNO – 10	1B	16D	1Q	3Q,9P	0	30	403	4000	0,75b
T7: EB PRIMAVERA – 500	1B	18D	0	10P	0	29	357	4000	0,72c
T8: EB PRIMAVERA – 10	1B	13D	0	11P	1P	26	449	4000	0,65e
T9: FRAÇÃO HEX – 500	0	9D	0	4P	0	13	283	4000	0,32k
T10: FRAÇÃO HEX – 10	0	12D	0	12P	0	24	406	4000	0,60f
T11: FRAÇÃO CLO – 500	0	10D	0	11P	0	21	558	4000	0,52g
T12: FRAÇÃO CLO – 10	0	12D	0	10P	0	22	557	4000	0,55g
T13: FRAÇÃO AcOET – 500	0	13D	0	7P	0	20	312	4000	0,50h
T14: FRAÇÃO AcOET – 10	0	7D	0	15P	0	22	398	4000	0,55f
T15: FRAÇÃO BUT – 500	0	2D	0	3P	0	5	270	4000	0,12m
T16: FRAÇÃO BUT - 10	0	16D	0	12P	0	28	316	4000	0,70d
T17: CONTROLE POSITIVO	0	84D	0	1Q,2P	0	87	307	4000	2,17a
T18: CONTROLE NEGATIVO	1D	0	0	2Q	0	3	430	4000	0,07o
T19: CONTROLE DO DILUENTE	1B	9D	0	1P	0	11	417	4000	0,27l

Médias seguidas de letras iguais, não diferem pelo teste de χ^2 em nível de 5% de probabilidade de erro. Controle positivo: glifosato 1%; controle negativo: água destilada; controle do diluente: água destilada + DMSO 0,4%. B: binucleada; D: desorganizada; Q: quebra cromossômica; P: ponte cromossômica; M: micronúcleo.

O controle negativo T18 (água destilada) apresentou alterações cromossômicas (Ac) que podem ser atribuídas às modificações na fisiologia da planta, já que a água utilizada foi destilada sem a presença de impurezas. Essas foram desconsideradas devido à baixa porcentagem (0,07%), ou seja, menor que 1%.

O controle do diluente T19 (água + DMSO 0,4%) apresentou 0,27% de células com alterações, demonstrado um elevado número de células alteradas quando comparado com a água.

Como esperado o controle positivo T17 (glifosato 1%), apresentou a maior porcentagem de células com Ac (2,17%), apresentando principalmente células desorganizadas em prófase.

O tratamento do outono (T3) e a fração butanólica (T15) apresentaram o menor número de células com alterações (4 e 5 respectivamente) e significativamente diferentes. Esse resultado pode ser explicado pela diferença no número total de células observadas em divisão. Todos os demais tratamentos apresentaram mais células com alterações quando comparado com o controle negativo e o controle do diluente, diferindo estatisticamente destes.

As alterações cromossômicas mais observadas foram cromossomos desorganizados (D) durante a prófase, na maioria dos tratamentos, com exceção do T2 e do controle negativo, seguido de pontes anafásicas (P) observado em todos os tratamentos.

DISCUSSÃO

Os extratos e frações de *Richardia brasiliensis* foram avaliados quanto à capacidade antiproliferativa e efeito genotóxico através do teste *Allium cepa*. O índice mitótico (IM) foi obtido a partir das células observadas em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células observadas (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) (GADANO et al., 2002; VIEIRA et al., 2009). Já as alterações cromossômicas nos forneceram dados que permitiram avaliar a genotoxicidade de substâncias presentes em extratos e frações, sendo observado aberrações nos cromossomos durante as fases do ciclo celular. As substâncias genotóxicas possuem propriedades químicas e físicas que interagem com os ácidos nucléicos ocasionando defeitos em células germinativas e somáticas (VARANDA et al., 2006).

O IM obtido nos tratamentos foi comparado com o IM do controle positivo (glifosato 1%), negativo (água destilada) e do diluente (água destilada + DMSO 0,4%).

O efeito genotóxico foi determinado nesta pesquisa, comparando-se células com cromossomos normais (Fig. 1) e células com alguma alteração (Fig. 2), como célula binucleada (Fig. 2A), micronúcleo (Fig. 2B), cromossomos desorganizados (Fig. 2C), quebras cromossômicas (Fig. 2D e 2F) e ponte (Fig. 2E), na interfase ou durante as divisões celulares.

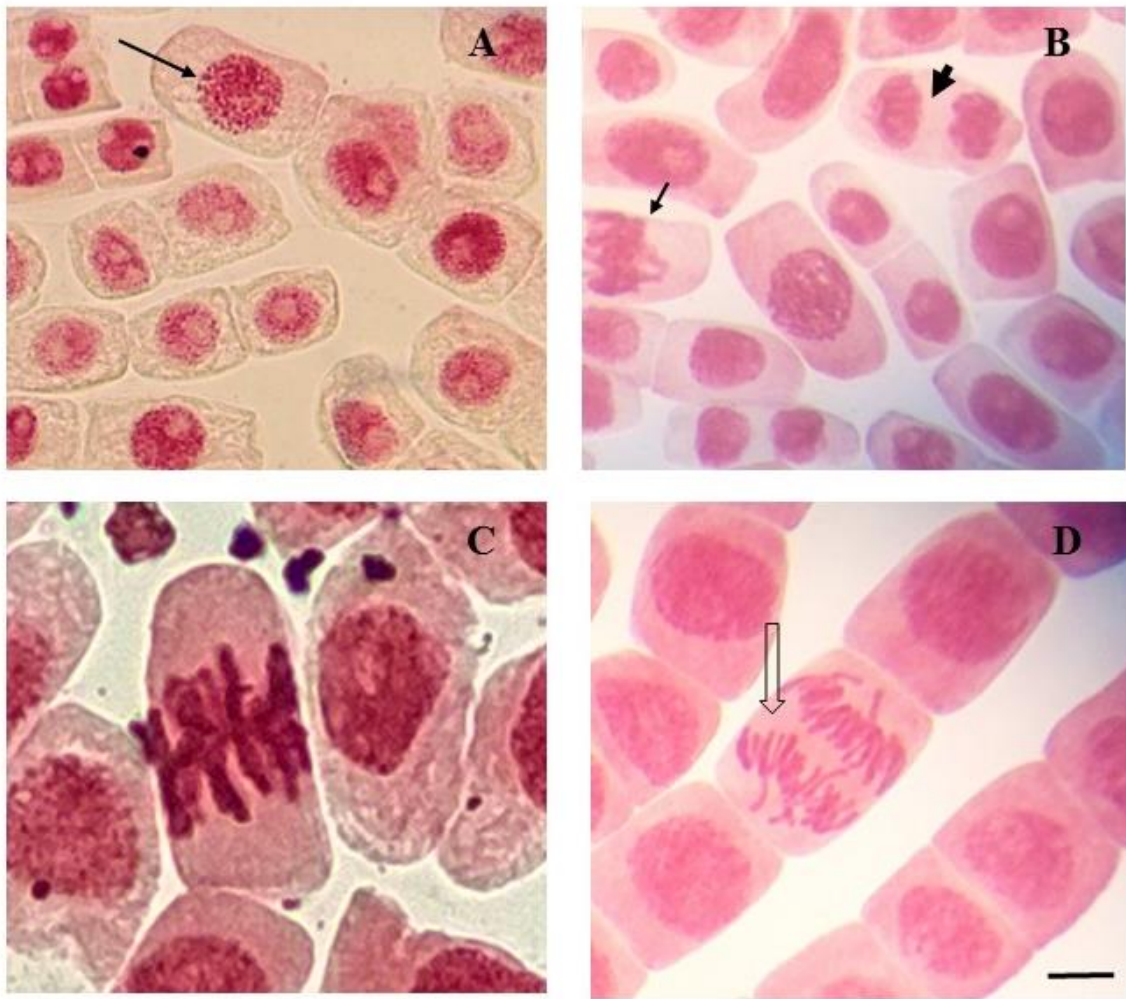


Figura 1 - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos com extratos e frações de *Richardia brasiliensis*. A) Células normais em interfase e prófase (seta preta longa); B) Célula normal em metáfase (seta preta curta) e telófase (seta preta curta com preenchimento); C) Célula normal em metáfase; D) Célula normal em anáfase (seta preta longa sem preenchimento). Aumento de 40 X. Escala 10 μ m.

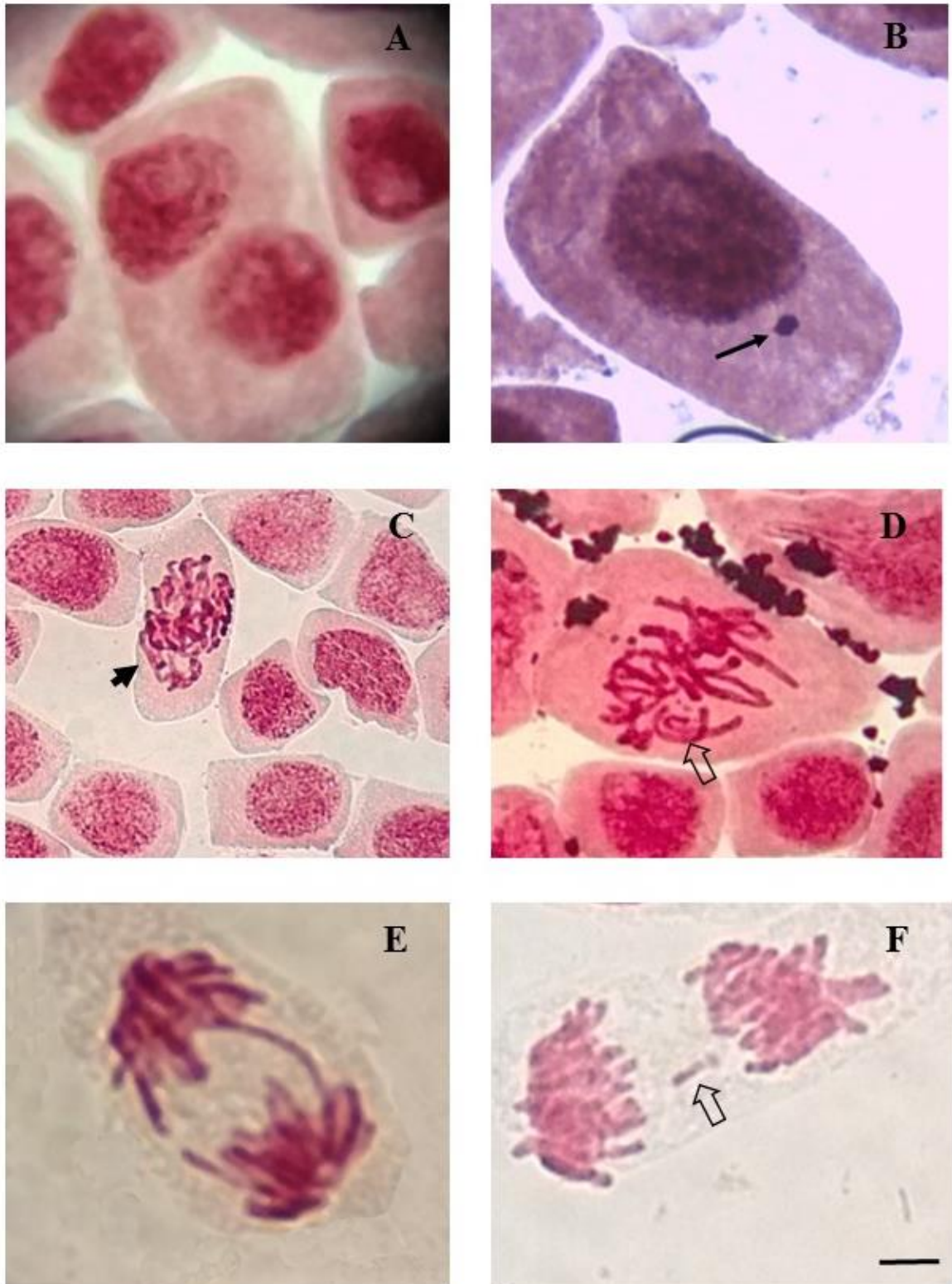


Figura 2 - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos com extratos e frações de *Richardia brasiliensis*. A) Célula binucleada; B) Célula com micronúcleo (seta longa preta); C) Prófase desorganizada (seta curta preta); D) Quebra cromossômica (seta curta sem preenchimento) em metáfase; E) Ponte anafásicas; F) Quebra cromossômica na telófase. Aumento de 40X. Escala 10 μ m.

Foi possível observar uma acentuada capacidade antiproliferativa nos extratos e frações de *R. brasiliensis* através da diminuição no IM no extrato bruto de outono e na fração butanólica, na concentração de 500 µg/mL, o que também foi observado em extratos de *Psychotria brachypoda*, obtido por infusão (5 e 20 g/L) por Frescura, 2012, diferindo da avaliação com *R. brasiliensis* no modo de obtenção dos extratos e na concentração destes. Em diferentes concentrações de extrato metanólico de *Euphorbia hirta*, Ping et al. (2012) também observou a dose dependência na diminuição da divisão celular através do ensaio com *A. cepa*.

O extrato bruto de *R. brasiliensis* apresentou no outono a maior concentração de flavonoides (28,90 mg/g) sendo a rutina quantificada em 26,25 mg/g nesta mesma estação (DORNELLES et al. 2015, não publicado), atribuindo a capacidade antiproliferativa à estes compostos.

A rutina está inserida no grupo dos flavonoides que atuam na quimio-prevenção do câncer, na inibição de fases do ciclo celular, na proliferação celular, no estresse oxidativo e na apoptose (PEDRIALI, 2005). Esta apresenta efeitos semelhantes aos produzidos pelo quimioterápico Neotaxel[®] sendo utilizada no tratamento de células tumorais de Ehrlich (MACHADO, 2006).

Outras atividades terapêuticas são atribuídas aos flavonoides, como a normalização da resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares, a melhora da insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com doenças hemorrágicas ou de hipertensão, inibem os radicais livres, e atuam em carcinomas (PEDRIALI, 2005; BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

O controle positivo apresentou IM de 7,67%, abaixo do IM do controle negativo. O glifosato utilizado como controle positivo neste estudo, atua inibindo especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, atuando na síntese de aminoácidos essenciais precursores na biossíntese dos compostos do metabolismo secundário (YAMADA; CASTRO, 2007).

Além disso, o glifosato inibe as divisões celulares atuando como um agente antiproliferativo e induz, comprovadamente, alterações cromossômicas (SOUZA et al., 2010), pois devido à sua atuação na biossíntese de aminoácidos aromáticos e na formação de proteínas desses aminoácidos ele reduz os níveis de proteínas, como a tubulina essencial na formação dos microtúbulos (YAMADA; CASTRO, 2007) afetando os estágios de divisão e levando a divisões aberrantes.

O DMSO é um solvente versátil e com pouca toxicidade quando utilizado em baixas concentrações, pois em altas concentrações e altas temperaturas age como desnaturante

proteico (TSUTOMU; YOSHIKO; TIMASHEFF, 2007), o que poderia levar a indução de alterações durante o ciclo celular. Por estas propriedades o DMSO (0,4%) foi usado como veículo para solubilizar as amostras, acrescentado à água destilada.

Essa substância possui a capacidade de dissolver compostos polares e não polares, é um composto anfipático, com um domínio altamente polar e dois grupos polares (FLORÃO et al., 2007). Por sua natureza polar o DMSO é capaz de aceitar ligações do hidrogênio e devido a estrutura compacta é responsável pela capacidade única de penetrar em tecidos vivos, associa-se com a água, proteínas, hidratos de carbono, ácido nucleico, substâncias iônicas e outros componentes (HEBLING et al., 2015).

O DMSO foi avaliado em estudo realizado por Maioral (2013) no tratamento de células leucêmicas com chalconas, para excluir a participação do veículo na possível citotoxicidade observada nos ensaios. Este apresentou viabilidade de 99,89% demonstrando que o DMSO não foi responsável pela morte celular observada no estudo.

O IM da fração butanólica (6,75%) na concentração de 500 µg/mL também foi menor que o controle negativo e pode ser atribuído à presença de fenóis, substâncias polares como os flavonoides glicosilados (FILHO; YUNES, 1998). Teixeira et al. (2003) sugeriram para as espécies *Psidium guajava* e *Achillea millefolium* que a inibição nas divisões celulares das raízes de *A. cepa* deve-se a presença de taninos em suas infusões.

Fachinetto e Tedesco (2009) citam que os extratos aquosos de *Baccharis trimera* e *B. articulata* contém taninos e flavonoides em sua composição química e também apresentaram atividade antiproliferativa, demonstrando que a capacidade de induzir inibições na divisão celular pode ser devido a presença de substâncias polifenólicas.

Na fração clorofórmica (CLO) em ambas concentrações o IM foi elevado quando comparado com os demais tratamentos. Segundo Filho e Yunes (1998) a fração CLO apresenta substâncias menos polares como flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas.

Em triagens fitoquímicas realizadas por Macedo (2014) na fração clorofórmica de *Selaginella convoluta* foi identificado a presença de derivados antracênicos, flavonoides, naftoquinonas e a presença intensa de triterpenos e/ou esteroides e a fração não induziu a morte celular, mas foram evidenciadas alterações histopatológicas e potencial citotóxico *in vitro* em células de macrófagos. Efeito citotóxico também foi encontrado por Felipe (2010), associado a efeitos antiproliferativos da fração clorofórmica de *Casearia sylvestris* em células do carcinoma de Ehrlich o que promoveu alterações no ciclo celular e inibiu a síntese de DNA e conseqüentemente a divisão celular. Nos estudos realizados na fração clorofórmica de

Maxillaria picta apresentou a atividade antiproliferativa mais promissora entre as demais frações sob onze linhagens de células tumorais (ALMEIDA et al., 2014).

Os resultados encontrados na fração CLO de *R. brasiliensis*, não corroboram com análises realizadas para estes outros modelos e espécies testadas, já que a fração CLO por ser citotóxica atuaria na diminuição das divisões celulares e não aumentando o IM como foi observado neste estudo.

As alterações observadas nas células de radículas de *A. cepa* submetidas aos extratos e frações de *R. brasiliensis*, foram 7 células binucleadas, 286 células desorganizadas, 2 micronúcleos, 23 quebras e 118 pontes cromossômicas. Assim, todos os tratamentos mostraram efeito genotóxico, porém considerado baixo quando comparado com o controle positivo. Todos os valores de Ac foram significativamente diferentes do glifosato que apresentou valores de 2,17%.

O extrato bruto de outono (T3) e a fração butanólica (T15) na concentração de 500 µg/mL foram os tratamentos com o menor índice de células com alterações (Ac), demonstrando que além de possuírem uma forte capacidade antiproliferativa, tiveram uma baixa genotoxicidade para as células, pois apresentaram 4 e 5 alterações, respectivamente, enquanto que o controle negativo apresentou 3 alterações cromossômicas.

Alterações nos cromossomos foram observadas no controle do diluente apesar do IM deste não ter diferido estatisticamente do controle negativo, demonstrando que mesmo sendo utilizado em baixa concentração o dimetilsulfóxido (DMSO) foi capaz de induzir danos às células. O DMSO normalmente é utilizado como veículo de diluição dos extratos, sem alterar a viabilidade celular (FELIPE, 2010; FERNANDES, 2011; ALMEIDA et al., 2014) sendo também utilizado como crioprotetor, evitando a cristalização da água e agindo na remoção dos radicais livres durante o processo de descongelamento (STURION et al., 2011). Segundo Antão (2014) o DMSO causou efeitos genotóxicos em linhagens celulares Hela e HepG2, demonstrando que esse solvente mesmo em baixa concentração possui alguma atividade mutagênica, pois tem a capacidade de inibir a ação de um antioxidante intracelular.

CONCLUSÃO

Na avaliação da capacidade antiproliferativa e genotóxica de extratos e frações de *Richardia brasiliensis*, determinou-se que a espécie possui potencial antiproliferativo na concentração de 500 µg/mL, com destaque para o extrato bruto obtido no outono (T3), no qual apresentou IM de 5,42% e para a fração butanólica (T15) com IM de 6,75%.

A capacidade antiproliferativa dos extratos de *R. brasiliensis* varia conforme a concentração testada, sendo que ocorre decréscimo do IM nas maiores concentrações.

Os extratos e frações de *R. brasiliensis* apresentam potencial genotóxico, apresentando alterações cromossômicas como células binucleadas, desorganizada, micronúcleos, quebras e pontes cromossômicas.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo faz-se necessário realizar novas análises com extratos e frações de *R. brasiliensis* em organismos eucarióticos e comparar os resultados entre estes sistemas testes a fim de avaliar a possível ação terapêutica da espécie.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, et al. Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*. **Química Nova**, v.37, n.7, p.1151-1157, 2014.

AYRES, M. **BioEstat 5.3**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5. ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2007.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, n.1, p.21-25, 2009.

CHAUAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, n. 3, p.181-189, 1999.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. S.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007.

FELIPE, K. B. **Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris***. 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FIGUEIREDO, A. D. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p.193-196, 2009.

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

FLORÃO, A. et al. Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.2, p.215-223, 2007.

FRESCURA, V. D. S. **Avaliação do Potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae)**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

GADANO, A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.11-16, 2002.

GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais. **Acta Botânica Brasiliensis**, v.3, p.185-224, 1989.

HEBLING, J. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. **Dental Material**, v.31, p.399-405, 2015.

HEMALSWARYA, S.; DOBLE, M. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. **Phytotherapy Research**, v.20, p.239-249, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odess, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MACEDO, L. A. R. O. **Efeito antinociceptivo das frações hexânicas e clorofórmica de *Selaginella convoluta* (Selaginellaceae)**. 2014. 203 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.

MACHADO, H. **Atividade dos Flavonoides Rutina e Naringina sobre o tumor ascético de Ehrlich “in vivo”**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAIORAL, M. F. **Investigação dos eventos apoptóticos induzidos por chalconas sintéticas derivadas de 1-naftaldeído e 2-naftaldeído sobre linhagens de células de leucemias agudas humanas**. 2013. 144 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.

MARSIGLIA, J. D. C. et al. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. **Natureza online**, v.9, n.1, p.30–34, 2011.

MATASUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronuclei test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148–158, 2006.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo. 2005.

PINTO, D.S. et al. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

RIBEIRO, J. C. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Austroplenckia populnea* (Reiss) Lundell chloroform fraction from barwood extract in rodent cells in vivo. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.4, p.1141-1147, 2009.

SOUZA, F. H. et al. Nova cumarina isolada de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. 2009.

SOUZA, L. F. et al. Genotoxic potential os aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v.67, p.871-877, 2010.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: Srivastava, J. **Environmental Contamination**. 2012.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

TSUTOMO, A.; YOSHIKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Protein precipitation and denaturation by Dimethyl Sulfoxide. **Biophysical Chemistry**, v.131, p.62-70, 2007.

UNNATI, S. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.11, n.1, p.0016-0023, 2013.

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

VIEIRA, A. et al. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.3, n.1, p.8, 2009.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **Encarte de Informações Agronômicas**, n.119, 2007.

3. DISCUSSÃO GERAL

A espécie *Richardia brasiliensis* possui metabólitos ativos de interesse medicinal que foram observados através de reações de caracterização colorimétricas, sendo identificado alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos, cumarinas, heterosídeos antociâncos, taninos, amino-grupos e ácidos orgânicos, estando de acordo com Figueiredo et al. (2010) que também determinou esses constituintes nas partes aéreas e raízes desta espécie.

A subfamília Rubioideae apresenta antraquinonas como marcadores quimiotaxonômicos (BOLZANI et al., 2001), porém neste trabalho não foi observada a presença desse grupo químico.

Os parâmetros estabelecidos para a droga vegetal indicam boa qualidade para o uso da espécie com fim medicinal, pois os teores determinados encontram-se dentro de valores preconizados na Farmacopeia Brasileira (2010) e na OMS (1998).

Os teores de cinzas totais em todas as estações (JA 14,13%, AB 20,02%, AG 30,01%, OU 24,83%) e cinzas insolúveis em ácido (JA 1,40%, AB 7,78%, AG 16,45%, OU 10,21%) foram elevados quando comparados com outras espécies como em *Rudgea viburnoides* que apresentou teores entre 10 e 11% (ALVES et al. 2004) e *Cynara scolymus* com porcentagem de 2,02% (COSTA et al. 2009) de cinzas totais. Nos códigos oficiais não foram delimitados esses parâmetros e os resultados encontrados para *R. brasiliensis* foram relacionado ao tipo de hábito da espécie, uma herbácea com desenvolvimento prostrado.

O extrato bruto de outono apresentou o maior rendimento (20,44%) com a maior concentração de flavonoides (28.90 mg/g). Rutina e ácido clorogênico foram identificados e quantificados e o extrato de outono obteve o maior percentual (26.25 mg/g) de rutina.

Os flavonoides se destacam por sua capacidade antioxidante devido às propriedades sequestrantes de radicais livres, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis, protegendo os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica (WOLLGAST; ANKLAN, 2000). Com isso, parte da ação farmacológica de *R. brasiliensis*, deve-se a presença marcante desse grupo químico nos extratos e frações em significativas concentrações nas diferentes estações do ano.

As diferenças observadas nas concentrações de compostos químicos e nos parâmetros de qualidade do material vegetal podem estar relacionadas as variações que ocorrem na fisiologia da planta que estão sujeitos a influência das variáveis ambientais, bióticos e

abióticos, interferindo na qualidade e quantidade de produtos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em estudos anteriores com a espécie, foram identificadas e isoladas substâncias como flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, compostos fenólicos, cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos antociânicos, taninos e amino-grupos (PINTO 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; SOUZA, 2009; DORNELLES et al. 2015, não publicado). A partir de análises histoquímicas nas folhas e caule de *R. brasiliensis*, foram determinados *in situ* lipídios de reserva e estruturais, com a utilização de reagentes específicos em microscopia de campo claro e microscopia de fluorescência. Nos vacúolos e paredes celulares foram observados compostos fenólicos, com o reagente dicromato de potássio e azul de toluidina para regiões lignificadas. Pigmentos antociânicos foram visualizados em células do córtex externo, imediatamente abaixo da epiderme sem a utilização de reagentes colorimétricos. Substâncias de coloração amarelo fluorescente indicativas de cumarinas e/ou flavonoides foram observadas a partir de microscopia de fluorescência quando submetidos a soluções alcalinas.

Os alcaloides foram visualizados somente com o reagente de Wagner. De acordo com Costa (1982), Simões et al. (2007) e Karabourniotis et al. (2001) um mesmo grupo de substâncias necessita de mais de um reagente, pois muitas vezes não ocorre a reação pela falta de especificidade do reagente. Para que não ocorra interferência na pigmentação natural da substância analisada, devem ser utilizadas também amostras em branco (SILVA, 2014).

A capacidade antiproliferativa e genotóxica dos extratos e frações de *R. brasiliensis* foi determinada a partir do ensaio de *Allium cepa*. Os estudos citogenéticos de plantas reportam alterações cromossômicas durante o ciclo celular pela presença de substâncias mutagênicas. O cálculo do índice mitótico (IM) é utilizado como indicador da proliferação das células e determinado a partir do número de células observadas em divisão pelo número total de células observadas (VIEIRA et al., 2009; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

O extrato bruto obtido no outono apresentou IM de 5,42% e a fração butanólica IM de 6,75%, ambos na concentração de 500 µg/mL, apresentando IM inferior ao encontrado para o controle negativo, demonstrando capacidade antiproliferativa e um baixo número de alterações celulares. A capacidade antiproliferativa do extrato pode ser atribuída a presença de compostos fenólicos presentes em maior concentração nesta estação quando comparado com as demais e a fração butanólica (FILHO; YUNES, 1998) também possui compostos fenólicos como flavonoides glicosilados. Outros autores (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO; TEDESCO, 2009) sugerem que as inibições das divisões celulares ocorrem pela presença fenóis.

4. CONCLUSÕES

- Os parâmetros de qualidade da droga vegetal como matéria estranha e porcentagem de água estão de acordo com valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira;
- Os teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido foram elevados;
- O maior rendimento de extrato foi obtido no outono;
- Os metabólitos secundários antociânicos, taninos, amino-grupos, esteróides e/ou triterpenos, alcaloides, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides foram caracterizados nos extratos;
- Os flavonoides em maior concentração foram quantificados no extrato de outono;
- Rutina e Ácido clorogênico foram determinados e quantificados nos extratos;
- Lipídios de reserva e estruturais, compostos fenólicos, antocianinas e alcaloides foram determinados a partir de análise histoquímica;
- *Richardia brasiliensis* apresenta capacidade antiproliferativa;
- *Richardia brasiliensis* é genotóxica.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de Fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, 2001.

ALVES, M. M. et al. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. **Scientia Plena**, v.7, n.12, p.1-8, 2011.

ALVES, R. M. S. et al. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.49-56, 2004.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamentos de Alimentos**, v.24, n.2, p.319-336, 2006.

ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RE nº 90 de 16/03/2004, Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápico. Brasil, 2004.

ARGENTA, S. C. et al. Plantas Mediciniais: cultura popular versus ciência. **Vivência**, v.7, n.12, p.51-60, 2011.

BARBERENA, I. et al. Screening of Anticancer and Immunomodulatory Activities of Panamanian Plants. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.7, p.552-558, 2004.

BEEK, T. V. et al. Recent developments in the rapid analysis of plants and tracking their bioactive constituents. **Phytochemistry Reviews**, v.8, p.387-399, 2009.

BOLZANI, V. S. et al. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomic and biological significance. **Recent Research Development in Phytochemistry**, v.5, p.19-31, 2001.

BORHIDI, A. **Rubiaceae de México**. 2.ed. Akadémiai Kiadó. 2012. 48p.

BOTH, F. L. **Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotrina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. 2005. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêutico) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

CANELHAS, B. B. **Estudo químico, análise do óleo essencial e avaliação das atividades antioxidantes e antibacteriana do Marmelhinho [*Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze (Rubiaceae)]**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, c.20, p.519.

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

CHAUAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, n.3, p.181-189, 1999.

COELHO, A. P. D. **Potencial Genotóxico e Antiproliferativo dos extratos de *Echinodorus grandiflorus* e *Sagittaria montevidensis* (Alismataceae)**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.170-177, 2006.

COELHO, V. P. M.; LEITE, J. P. V.; NUNES, L. G.; VENTRELLA, M. C. Anatomy, histochemistry and phytochemical profile of leaf and stem bark of *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae). **Australian Journal of Botany**, v.60, p.49-60, 2012.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1982, 1032p.

COSTA, R. S. et al. Caracterização física, química e físico-química de extrato seco por nebulização (*spray-dryin*) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.3, p.169-174, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

COUTO, A. G.; VITORINO, J. C.; SILVA, R. M. L. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. **Fármacos e medicamentos, uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. cap. X, p.241-308.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agentes. **Ethnopharmacology**, v.1, p.72-79, 2005.

CRONQUIST, A. An integrated system of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1262 p., 1981.

DELMONDES, P. H. et al. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Revista Eletrônica da Univar**, v.1, n.9, p.1-5, 2013.

DELPRETE, P. G. Notes on calycophyllum Rubiaceae. Part III. Systematic position of the monotypic Mexican genus *Cosmo Calyx* and notes on the calycophyllum Development, **Brittonia**, v.50, p.309–317, 1998.

DELPRETE, P. G. Rubiaceae. In: SMITH, N. P. et al. (Eds.). **Flowering plant families of the American tropics**. Princeton University Press, New York: Botanical Garden, 2004, p.328-333.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguesia**, v.63, n.1. p.101-128, 2012.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. B. Rubiáceas. Vol. 2 – Gêneros de H-T: 20. Gardenia até 46. Tocoyena (com observações ecológicas por Klein, R.; Reis, A.; Iza, O.). In: Reis, A. (ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 2005, p. 624-649.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN. Rubiáceas. Vol. I. In: REIS, A. (ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 2004. p.1-344.

DENNY, C. et al. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.598-603, 2007.

DORNELLES, R. C. et al. Seasonal background of the physico-chemical quality control parameters and phytochemical profile of *Richardia brasiliensis* Gomes. *Braz J of Pharm. Sci.* No prelo 2015.

DUARTE, I. D. et al. Investigação genotóxica do extrato aquoso de *Rhizophora magle* L. em ratas *Wistar*. **Natureza on line**, v.13, n.2, p.77-81, 2015.

ENGEL, I. C. et al. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.258-264, abr/jun. 2008.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FARIAS, F. M. **Psychotria myriantha Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica e sobre o sistema nervoso central**. 2006. 217 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, c.12, p.263.

FARMACOPEIA Brasileira. 4ª ed. São Paulo: 1988. pt.1, p.V.4.2.3.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. Brasília: 2010. pt.1, p.192-204.

FERREIRA, K. F. C.; NARDIN, J. M. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do extrato de *Bauhinia glabra* em células linfocitárias normais. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.1, n.13, p.79-92, 2015.

FIGUEIREDO, A. D. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p.193-196, 2009.

FIGUEIREDO, A. D. L. et al. Determinação de Parâmetros para o Controle de Qualidade da *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.2, p.192-197, 2010.

FILHO, S. C. V. **Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici (*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. ex Juss).** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

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

FONSECA, M. C. M. **Epamig pesquisa, produção de Plantas Mediciniais para a Aplicação no SUS.** Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

FRESCURA, V. D. S. **Avaliação do potencial Antiproliferativo, Genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae).** 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GADANO, A. et al., *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.11-6, 2002.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Serie Fisiologia Vegetal**, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos.** 3ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511p.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GROTH, D. Identificação botânica de plantas e sementes de espécies invasoras na cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.2, n.3, p.59-95, 1980.

HENRIQUES, A. T. et al. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento.** 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, c.29, p.765.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9ed. Guanabara Koogan, 2012. 376p.

KARABOURNIOTIS, G. et al. Epicuticular phenolics over guard cells: exploitation for in situ stomatal counting by fluorescence microscopy and combined image analysis. **Annals of Botany**, v.87, p.631-639, 2001.

KAUR, R.; KAPOOR, K.; KAUR, H. Plants as a source of anticancer agents. **Journal of Natural Products and Plant Resources**, v.1, n.1, p.119-124, 2011.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo III – 2ed. São Paulo: BASF, p.421- 424, 2000.

LEWIS, W. H.; OLIVER, R. L. Revision of *Richardia* (Rubiaceae). **Brittonia**, v.26, p.271-301, july/sep. 1974.

LIMA, G. S. et al. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p.284-289, jan/mar. 2009.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1991. 440p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 4.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 440p.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MASA, C. V. **Metabolismo Secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente**. Memoria descrita (Grado de Doctora en Ciencias) – Universidade de Extremadura, Badajoz, 2011.

MATASUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronuclei test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations en onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 148 – 158, 2006.

MELO, J. G. **Controle de qualidade e prioridades de conservação de plantas medicinais comercializadas no Brasil**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

MENDONÇA, A. C. A. M. et al. Prospecção fitoquímica de *Psychotria colorata* (Willd. Ex. R. & S.) Müll. Arg. e *P. hoffmannseggiana* (R. & S.) Müll. Arg. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v.13, n.2, mar, 2015.

MIATELO, J. H. B. **Biodiversidade e distribuição da Família Rubiaceae no Distrito Federal e nos Estados de Goiás e Tocantins**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2008.

MICHELIN, D. C. et al. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.18-22, 2010.

MORAIS, E. C. et al. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v.12, n.4, p.619-622, 2013.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, p.11-19, 2002.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.31, jul/dez, 2003.

MOURA, L. T. S.; MARUO, V. M. Aspectos farmacológicos e toxicológicos de *Psychotria colorata* – Revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n.23, p.1-16, 2014.

NETO, S. J. S.; PEIXOTO, A. L. **Rubiaceae do Parque Nacional do Itatiaia**. 2012. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. **Fármacos e medicamentos, uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. cap. I, p.1-16.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Triterpenos e sua importância químico-medicinal. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí, 1ª ed, Editora UNIVALI, p 237-258. 2007.

OLIVEIRA, A. C. O. et al. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, A. P.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do avelós (*Euphorbia tirucalli*) em *Drosophila melanogaster*. **Bioscience Journal**, v.20, n.2, p.179-186, 2004.

OLIVEIRA, V. B. **Alcaloides indólicos de *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae)**. 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Quality control methods for medicinal plant materials, 1998. p.122.

PAIVA, A. M.; FILHO, P. G.; MOURA, M. V. L. P. Rubiaceae ornamentais do Campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. **Floresta e Ambiente**, v.16, n.1, p.39-46, 2009.

PEDRINHO-JÚNIOR, A. F. F.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.53-61, 2004.

PERBONI, L. T. et al. Influência da temperatura, luz e pré-tratamentos na germinação de sementes de *Richardia brasiliensis*. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. 2010. Ribeirão Preto. **Anais**. 2010.

PEREIRA, G. F. **Família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermaceae**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F. C. P. Rubiaceae Juss. Da Reserva Florestal Mata do Paraíso. Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, n.1, p.207-224, 2006.

PING, K. Y. et al. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* assay. **Molecules**, v.17, p.7782-7791, 2012.

PINTO, D. S. et al. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

PINTO, D. S. **Primeiros estudos quimiotaxonômicos do gênero *Richardia*: fitoquímica da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2008. 145 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

PORTO, M. L. et al. **Flora ilustrada do Rio Grande do Sul: Tribo Spermaceae Rubiaceae I. Fascículo XII**. 1977. 114p.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestre em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8.ed. Guanabara Koogan, 2014. 876p.

RINNERT, C. H. **Análise estrutural de folhas de *Senna multijuga* sunsp. *Lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinoideae) e localização *in situ* de compostos com ação biológica de interesse farmacológico**. 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.

ROCHA, F. A. G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v.1, p.1-13, 2015.

ROSSETO, R.; PITELLI, R.M.; PITELLI, R.A. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: Poaia-Branca. **Planta Daninha**, v.15, n.1, 1997.

SANTOS, G. J. L.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.2, p.218-241, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, c.16, p.403.

SCHOTT, P.C.; CANTO-DOROW, T.S. Benefícios potenciais de plantas daninhas: uma perspectiva de educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.4, n.4, p.524-529, 2011.

SCHIPPER, L. P. (Ed.). **Segredos e virtudes das Plantas Mediciniais**. Um guia com centenas de plantas nativas e exóticas e seus poderes curativos. Reader's Digest, Rio de Janeiro, 1999. 416p.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcaloides indolicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, c.31, p.819.

SILVA, C. R. et al. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n.1, p.01-03, 2004.

SILVA, G. A. **Avaliação da genotoxicidade do extrato de *Mikania laevigata* no dano em DNA causado pela exposição aguda a poeira do carvão**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.

SILVA, G. M. **Embriogênese somática, hibridização in situ e histoquímica de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims)**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Mato Grosso, Tangará da Serra, 2014.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Avaliação de parâmetros de extração da Cinchona Vahl por métodos farmacopeicos e não farmacopeicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.776-780, jul/set. 2009.

SILVA, R. M. R. J. et al. Analysis of *in vitro* activity of high dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. in human melanoma cells. **International Journal of High Dilution Research**, v.10, n.36, p.183-193, 2011.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, 1102p.

SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2007, c.18, p.467.

SOUZA, F. C. **Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16^{INK4A} replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q**. 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUZA, F. H. T. **Estudos fitoquímicos e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 194 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

SOUZA, F. H. T. et al. Nova cumarina isolada de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Fortaleza, **Anais**, 2009.

SOUZA, M. C.; CISLINSKI, J.; ROMAGNOLO, M. B. Levantamento florístico. In: VAZZOLER, A. E. A.; AGOSTINHO, M. A. A.; HAHN, N. S. (eds.). **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá, EDUEM. 1997. p. 343-368.

SOUZA, M. V. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v.27, n. 2, p.308-312, 2004.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.1, p.140-156, 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768p.

STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.637-642, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Artmed editora, 2013. 954p.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: SRIVASTAVA, J. **Environmental Contamination**. 2012.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

TESTA, G. et al. Constituintes químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Química Nova**, v.35, n.3, p.527-529, 2012.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

UNNATI, S. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.11, n.1, p.0016-0023, 2013.

VALENTE, L. M. M. et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologias por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.216-223, 2006.

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

VENTRELLA, M. C. et al. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Série conhecimentos. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal. 40p. 2013.

VIEIRA, A. et al. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.3, n.1, p.8, 2009.

VILELA, J. D. Natural life. **Revista da Associação Paulista de Medicina**, v.89, p.115, 1997.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1.ed. Chapecó: Editora Argos, 2001. 523p.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, v. 33, n.6, p.449-459, 2000.

**Seasonal background of the physico-chemical quality control
parameters and phytochemical profile of *Richardia brasiliensis*
GOMES**

**RAFAELA CASTRO DORNELLES^{1*}; GABRIELA CAMERA LEAL¹; ANA
CARLA DECIAN¹; DANIELE DAMIAN DOS SANTOS¹; GABRIEL AUGUSTO
RADISKE¹, RACHEL DE LIMA¹; RITIEL CORREA CRUZ¹; JULIANA CALIL
BRONDANI¹; MELÂNIA PALERMO MANFRON¹.**

¹Federal University of Santa Maria, RS
*Street Avenue Roraima, 1000
Suburb Camobi
Science Center of Healths / Building 26
Room 1137
Post code: 97015-900
Santa Maria/ Rio Grande do Sul
rafacdornelles@gmail.com

ABSTRACT

Richardia brasiliensis Gomes is an herbaceous species classified within the Rubiaceae family. This species is commonly present in regions with intense agricultural activity and is used in popular medicine as antiemetic, anti-diabetic, and anthelmintic against haemorrhoids, cure eczema and burns. This research determined the quality control parameters of the herbal drug, quantified secondary metabolites by spectrophotometry, characterized compounds with colorimetric reactions and identified and quantified two polyphenolic substances by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD) in *R. brasiliensis* within different seasons of the year. The quality of the herbal drug and the concentration of active substances varied in different periods, with a higher yield of the crude extract and a higher concentration of flavonoids in April (autumn). The extraneous material and the water percentage were found within the recommended values by the Brazilian Pharmacopoeia. The swelling index signalled the presence of mucilaginous substances and, the levels of total and acid-insoluble ash showed high results when compared to other species. Through colorimetric reactions the presence of anthocyanin glycosides, tannins, amino groups, steroids and/or triterpenes, alkaloids, coumarins, flavonoids and organic acids was determined.

KEY WORDS: *Richardia brasiliensis* Gomes. Quality control. Dosing metabolites. HPLC-DAD. Colorimetric reactions. Seasoning variation.

Estabelecimento sazonal dos parâmetros de controle de qualidade físico-químico e perfil fitoquímico de *Richardia brasiliensis* GOMES

RESUMO

Richardia brasiliensis Gomes é uma espécie herbácea, classificada dentro da família Rubiaceae, presente em regiões com intensa atividade agrícola e utilizada na medicina popular como antiemética, antidiabética, vermífuga e contra hemorroidas, na cura de eczemas e em queimaduras. Esta pesquisa, determinou parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal, dosou metabólitos secundários através de espectrofotometria, caracterizou compostos através de reações colorimétricas e identificou duas substâncias polifenólicas através de HPLC-DAD em *R. brasiliensis* G. nas diferentes estações do ano. A qualidade da droga vegetal, e a concentração de substâncias ativas, variaram nos diferentes períodos, apresentando um maior rendimento do extrato bruto e uma maior concentração de flavonoides em Abril (outono). A matéria estranha e a porcentagem de água determinados estão dentro dos valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira. O índice de intumescência sinalizou a presença de substâncias mucilaginosas e os teores de cinzas totais e insolúveis em ácido, apresentaram resultados elevados quando comparados com outras espécies. Através de reações colorimétricas foi determinado a presença de heterosídeos antocianicos, taninos, amino-grupos, esteróides e/ou triterpenos, alcaloides, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides.

UNITERMOS: *Richardia brasiliensis* Gomes. Controle de qualidade. Doseamento de metabólitos. HPLC-DAD. Reações colorimétricas. Variações sazonais.

INTRODUCTION

Richardia brasiliensis Gomes is a South American native species, belonging to the family Rubiaceae, sub-family Rubioideae, tribe Spermacoceae (Lorenzi, 2008). This plant is part of the poaia groups, commonly known by poaia-branca, ervaço or ipeca.

R. brasiliensis is typically found in regions with intense agricultural activity, such as the Brazilian South and Midwest regions. This herb grows spontaneously in crops and is considered one of the biggest problems of weed infestations in agricultural areas (Rosseto *et al.*, 1997; Monquero, Cury, Christoffoleti, 2005; Schott, Canto-Dorow, 2011). It is an annual cycle species and has capability to adapt in to different planting systems, infesting annual or perennial crops. It grows near the soil surface and

has a thick pubescent stem. Its inflorescence is in a glomerular form surrounded by 2, 4 or 6 foliaceous bracts, its flowers are generally hexamers, the sepals are usually in number of 6 white or pinkish corolla, with a ring of hairs on its inner face (Lorenzi, 2008).

Previous researches (Pinto, 2008; Pinto *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2009; Souza, 2009; Souza *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2013) identified coumarins, flavonoids, alkaloids, steroids, triterpenes, phenolic compounds and organic acids, and those are important substances which justifies the usage of this plant as a therapeutic agent resource. Furthermore, *R. brasiliensis*, in popular medicine, is used as antiemetic, antidiabetic, anthelmintic in the haemorrhoidal treatment, cure eczema and burns (Souza, 2009).

The Rubiaceae family is economically important and is being used in the food, ornamental and medicinal fields (Coelho *et al.*, 2006). Moreover, this family has a big plasticity in its chemical composition, presenting a huge variety of compounds with potential pharmacological effects (Souza, Mendonça, Silva, 2013).

To use this species as an efficient and safe drug it is important to establish the quality control parameters of the herbal drug. It is also important to comprehend how different seasons of the year can influence the plants biological system, increasing or decreasing the quality and concentration of active substances presents in the plant.

The Rubiaceae family is historically important in the medicinal field and *Richardia brasiliensis*, presents important chemical compounds justifying the seasonal studies to establish physical and chemical quality control parameters and phytochemical profile of this species.

MATERIALS AND METHODOLOGY

Botanical material

The herbal material is composed by the aerial parts of *R. brasiliensis* and was collected at the campus of the Federal University of Santa Maria (UFSM) (S29°43.277'

W053°42.844'). One sample of this plant was identified by the Dr. Thais do Canto-Dorow and the proof material was deposited on the herbarium in the Biology Department of Santa Maria (SMDB) at UFSM, registered with the number 13966.

Harvest of material were made during summer, autumn, winter and spring in the months of January (JA), April (AP), August (AG) and October (OC) respectively during the year of 2013. After the harvest, the material was dried in a circulating air oven at a temperature of $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for a period of seven days and ground in a Wiley mill.

The crude extract (CE) hydro ethanoic (70%) was obtained by maceration, with renewal of the solvent until the depletion of chemicals, then it was dried with lyophilisation and the yield calculated.

Quality control parameters

The quality control parameters of the herbal drug were made by physico-chemical tests (purity and integrity test) according to the 5^a edition of Brazilian Pharmacopoeia (2010).

The extraneous material, swelling index, water content, content of total ash and acid-insoluble ash, were assessed directly on the herbal drug.

Spectrofometric quantification of secondary metabolites was performed in the CE.

The quantification of total polyphenols were made from Chandra and Mejia proceedings (2004). For this determination, the reagent Folin-Ciocalteu (1N) was used and the results were expressed in equivalent gallic acid milligrams per gram of dried extract. With these results it was made possible to create an equation for the standard curve at concentrations of 1.0; 3.0; 5.0; 10.0 and 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The extracts were made at 0,04% of distilled water and the readings were performed in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1201) at a wavelength of 730 nm.

In flavonoids quantification, quercetin was used as standard, and a solution of aluminium chloride, as colour reagent. The samples were prepared at 0.04% of dry extract in 70% methanol. The total flavonoid content is expressed in equivalent quercetin milligrams per gram of each extract. The standard curve equation for the

quercetin was obtained at concentrations of 5.0; 10.0; 15.0; 25.0 and 30.0 µg/mL. The reading was performed at 425 nm (Rio, 1996).

The method of vanillin, according to Agostini-Costa, Lima and Lima (2003), was used to determine tannins, using catechin as a pattern and the reading done at 490 nm.

The total content of tannins was expressed as milligrams of equivalent catechin milligrams per gram of dry extract each. The concentrations used for obtaining the calibration curve were 25.0; 150.0; 300.0; 450.0; 600.0; 800.0 and 900.0 µg/mL.

Identification of the chemical compounds

The phytochemical characterization was realised by colorimetric methods, according to Moreira (1979), Wagner and Bladt (1996), Costa (1982). To research anthocyanin glycosides, saponins, cyanogenic glycosides, tannins and amino groups was prepared an aqueous extract at 20%; and a 20% alcoholic extract for alkaloids, flavonoids, coumarins, anthraquinones, steroids and triterpenes. The analyses were made in triplicate.

Phytochemical profile

The crude extracts were analysed by chromatographic analysis using a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array detector (HPLC-DAD) to chemically identify the polyphenolic constituents of *R. brasiliensis* according to the method published by Evaristo and Leitão (2001) adapted.

To separate the compounds by HPLC-DAD was used liquid chromatography (Shimadzu, Kyoto/Japan) compound pump model LC-20AT, auto sampler SIL-20A, detector SPD DAD-M20A and communicator 20A and CBM controlled by software LC SP1. The analytical column used was Shim-pack CLC-ODS (M), 5 µm particle diameter, dimensions of 4.6 mm x 150 mm. The elution gradient occurred flow 0.9 mL/min using two mobile phases: A, consisting of 2% acetic acid in water and, B, using

only methanol UV/HPLC. The sample injection volume was 40 μL , and the accompanied photodiode array detection system for wavelengths between 230-400 nm for 55 minutes. The identification of the polyphenols has been carried out by comparing the retention time of the samples and the absorption spectrum in cited band, with the standard solutions and quantitation by preparing standard curves. The standards of phenolic compounds tested were: pyrogalllic acid, gallic acid, pirocatechin, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin and kaempferol.

The compounds identified in the extracts were quantified by preparing standard curves, through dilution of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution in MeOH UV/HPLC to achieve the following: 5.0; 10.0; 25.0; 35.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solutions. The quantified concentrations of the substances were calculated from the equation of the line and results were expressed in equivalent milligrams of each pattern for each gram of the extract.

Statistics analysis

The data obtained from the extracts made in the different seasons were evaluated by analysis of variance and the comparison among the medians was generated through the Tukey test (≤ 0.05), using a specific program.

RESULTS AND DISCUSSING

Quality control parameters

The quality control parameters for the herbal drug, *R. brasiliensis*, in the four seasons (Table I) show that environmental change to which the plant is subjected, can be responsible for the difference in these established parameters. Which was also discussed by Gobbo-Neto and Lopes (2007), who attributes the variation in the

secondary metabolism of plants due to harvest conditions, and the environmental influence (light, altitude, pollution, nutrients, radiation, water availability, temperature, etc.).

TABLE I. Physico-Chemical parameters of quality control *R. brasiliensis*.

TIME OF COLLECTION	EXTRANEOUS MATERIAL (%)	SWELLING INDEX (mL)	WATER IN THE PLANT DRUG (%)	TOTAL ASH (%)	ACID INSOLUBLE ASH (%)
JA	0.12 ^b ± 0.12	7.74 ^a ± 0.20	9.63 ^a ± 0.14	14.13 ^c ± 0.46	1.40 ^c ± 0.56
AP	0.27 ^{ab} ± 0.13	3.56 ^b ± 0.18	6.33 ^d ± 0.12	20.02 ^b ± 2.12	7.78 ^b ± 1.18
AG	0.53 ^a ± 0.10	5.34 ^{ab} ± 1.57	7.57 ^c ± 0.34	30.01 ^a ± 2.49	16.45 ^a ± 2.65
OC	0.55 ^a ± 0.07	6.16 ^a ± 0.10	8.86 ^b ± 0.18	24.83 ^a ± 0.96	10.21 ^{ab} ± 0.52

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October.

Medians followed by similar letters do not differ by the Tukey test at 5% level.

The percentage of the strange matter, which means the presence of mineral impurities or other parts of the plant than the drug Brazilian Pharmacopoeia itself that was collected was bigger during OC (0.55%), and did not significantly differ from AG period (0.53%). The percentage of drug's impurities elements on the drug should not be more than 2% m/m, (Brazilian Pharmacopoeia, 2010) and the four samples tested presented results below this level. The herbal drug to be used must be free from any form of strange matter, and drugs contaminated by fungus, insects, or other materials should not be used for medicinal purposes (OMS, 1998).

The foreign material observed in these samples is mostly compound by soil particles, which can be explained by this species growing close to the ground and have a thick stem hair, increasing the contact between the plant and soil. Nevertheless, the World Health Organization (1998) indicates that any foreign material such as earth, stones, sand and dust have to be removed before the usage of the herbal drug.

The swelling of the drug, is related to the presence of mucilage and other polysaccharides present in *R. brasiliensis*. As can be observed, the values obtained for the swelling, had the highest rates in JA (7.74 mL) and OC (6.16 mL) with no significant difference. In AG it has given a rate of 5.34 mL and 3.56 mL on AP.

The gravimetric method was used for the analysis of water in the herbal drug. As it is shown, there were significant differences in the samples, and it was observed a higher water content in JA (9.63%).

The Brazilian Pharmacopoeia (2010), does not determine the optimum range of water content in the dried plant, but the Brazilian Pharmacopoeia 1988, requested for values between 8 and 14% (m/m), thus, the plant material collected in JA (9.63%) and OC (8.86%) are within this range and the material collected during AP (6.33%) and AG (7.57%) are below. The residual water found in the herbal drug may lead to microbial contamination and degradation of the chemical constituents by hydrolysis (Michelin *et al.*, 2010), therefore a lower amount of residual water, as the ones observed in *R. brasiliensis*, is recommended for a better stability of the herbal drug.

The content of total ash, provides the amount of material that remain adherent to the drug after incineration, determining the presence of a "physiological ash", which are derived from plant tissue itself and ash "non-physiological" which is a residue of impurities that adhere to the surface of the plant as sand and soil (WHO, 1998).

Samples of AG and OC had the highest total ash content (30.01% and 24.83% respectively), with no significant difference between them. The lowest total ash value occurred in summer, 14.13%, which matches with the value (14.05%) that was found by Figueiredo *et al.* (2010) in the aerial parts of *R. brasiliensis*.

In the botanical and chemical characterization in *Rudgea viburnoides*, another species of the Rubiaceae family, Alves *et al.* (2004) found ash content between 10 and 11%. While Costa *et al.* (2009) determined a percentage of 2.02% in *Cynara scolymus* an Asteraceae and Vigo, Narita, Marques (2004), found values of total ash of 6.5% for both the winter and spring, 4.3% in the summer and 4.4% in the autumn when they analyzed the roots of *P. glomerata* belongs to the Amaranthaceae in different seasons.

The values in *R. brasiliensis*, in all seasons, are higher than the ones found in these studies, even when related species belonging to the same family. This parameter may be related to the type of habits of this species, as it is an herbaceous with prostrate development.

The acid-insoluble ash, allows to determine the presence of inorganic impurities, such as silica and siliceous constituents of the drug (Macedo *et al.*, 2013). Levels up to 1% are acceptable when considered a plant that is not rich in silicic acid or silicates (Frasson, Bittencourt, Heinzmann, 2003). The levels found in the species under study, exceeded this value in all seasons.

To determine the concentration of total polyphenols, the equation was obtained from the standard curve ($y=0.0386x-0.0181$), with r of 0.9993. The highest total polyphenols was observed in OC, with content of 30.67 mg/g. For flavonoids, the highest concentration found was in AP (28.90 mg/g), and the equation obtained was $y=0.0127x-0.0019$ with r of 0.9952. In contrast to the tannins, the highest level was found in JA, and measured as 38.54 mg/g, from the equation $y=0.0002x+0.0024$ with r of 0.9973 (Table II).

TABLE II: Dosing total polyphenols, flavonoids and tannins within the seasons.

mg/g of CRUDE EXTRACT				
CONSTITUENTS	JA	AP	AG	OC
TOTAL POLYPHENOLS	26.37 ^{dB} ±0.46	28.09 ^{bA} ±0.07	27.32 ^{cA} ±0.16	30.67 ^{aA} ±0.25
FLAVONOIDS	15.73 ^{bC} ±0.39	28.90 ^{aA} ±0.73	27.75 ^{aA} ±0.57	27.50 ^{aB} ±1.09
TANNINS	38.54 ^{aA} ±0.19	12.45 ^{dB} ±0.12	15.82 ^{cB} ±0.66	17.20 ^{bC} ±0.19

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October.

Medians followed by the same letters do not differ from the Tukey test 5% level.

The concentration of total polyphenols, flavonoids and tannins in different plant species, has varied according to seasonal changes, demonstrating the importance that these factors have on the secondary metabolism.

Regarding to the concentration of flavonoids in *Davilla rugosa*, the highest levels of these active group of compounds, were found in summer and autumn in the Brazilian Southeast region (Macedo *et al.*, 2013). As flavonoids play a role as shields against photo-destruction, the increase in its concentration can be directly correlated with the increase in the intensity of solar radiation.

The water stress conditions to which the plant is subjected can lead to an increase in the concentration of flavonoids. In *Eugenia uniflora*, there is an increase in production when there is the combination of high solar irradiation and the lack of rain, which is related to the dry season (April to September) in the Midwest region (Santos *et al.*, 2011).

In *R. brasiliensis* the highest flavonoid content was observed during the autumn, in April and, the lowest, in January, during the summer. According to the data obtained from the National Institute of Meteorology (INMET), in both collections, January and April, the rainfall were close (145.3 mm and 147.4 mm respectively), but the insolation period has varied considerably (286.0 for the month of January and 209.0 for the month of April), which may explain the difference in concentrations of flavonoids.

For the tannins, the values obtained were inverse to what happened in flavonoids, with the highest concentration observed in January and the lowest in April. In species *D. rugosa*, the higher tannin levels were obtained in the summer (Macedo *et al.*, 2013). These results can be explained as the production of tannins become increased during the hot and humid periods, which coincides with the proliferation of insects and pathogenic microorganisms, when there is needed for the plant, a higher level of endogenous defenses (Barbehenn *et al.*, 2009)

The differences in the concentrations of chemicals in *R. brasiliensis* as in other species for medical use can make possible to infer that variations occurring in the biosynthesis of secondary metabolites is a complex process and it is subject to the influence of different environmental variables, such as biotic and abiotic factors influencing both the quality and the quantity of secondary products (Gobbo-Neto, Lopes, 2007).

Chemical Constituents

The chemical constituents of the aerial parts of *R. brasiliensis* were characterized by colorimetric reactions (Table III).

TABLE III. Phytochemical characterizing of *R. brasiliensis*.

CLASS OF COMPOUNDS	EA	EH
Anthocyanin glycosides	+	-
Saponinics glycosides	-	-
Cyanogenic glycosides	-	-
Gums, mucilage, tannins	+	-
Condensed tannins	+	-
Hydrolisable tannins	+	-
Amino groups	-	-
Steroids and (or) triterpenes	-	+
Cardioactive glycosides	-	-
Alkaloids	-	+
Free ortho and meta phenols	-	+
Free para phenol	-	+
Coumarins	-	+
Organic acids	-	+
Phenols	-	+
Anthraquinones	-	-
Flavonic glycosides	-	+

(EA): water extracted; (EH): hydro alcoholic extract.

(+): Presence; (-): Absence

The results of *R. brasiliensis*, matches with Figueiredo *et al.* (2010), who found alkaloids, flavonoids, steroids, triterpenes, coumarins and resins, the aerial parts of *R. brasiliensis* and coumarins, steroids, triterpenes, resins at its roots. This study also identified the presence of anthocyanin glycosides, tannins, amino groups and organic acids.

The presence of these substances in this species, justify its popular use, and demonstrate its importance as a medicinal drug. The Rubiaceae species have huge economical and pharmaceutical importance, because they are rich in secondary metabolites belonging to the iridoid class, terpenoids, flavonoids, tannins, quinones and especially alkaloids (Costa *et al.*, 2006).

According to Bolzani *et al.* (2001), the Rubiaceae family, has chemical markers for each one of the subfamilies, especially in Rubioideae, anthraquinones substances, which has not been identified by the method used.

Yield and profile of the crude extracts

The tests for determining the performance of CE are reported in table IV.

TABLE IV. Yield of the crude extract.

SEASONS	YIELD OF CE (%)
JA	20.30
AP	20.44
AG	19.58
OC	18.33

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October.

Phytochemical Profile

Chlorogenic acid and rutin were identified by HPLC-DAD (Figure 2) in the CE in all seasons and chromatographed under identical conditions to the commercial standards (Figure 1) to give 16.5 minutes retention time for chlorogenic acid, visualized at a wavelength of 327 nm and 28.6 minutes for rutin at a wavelength of 355 nm.

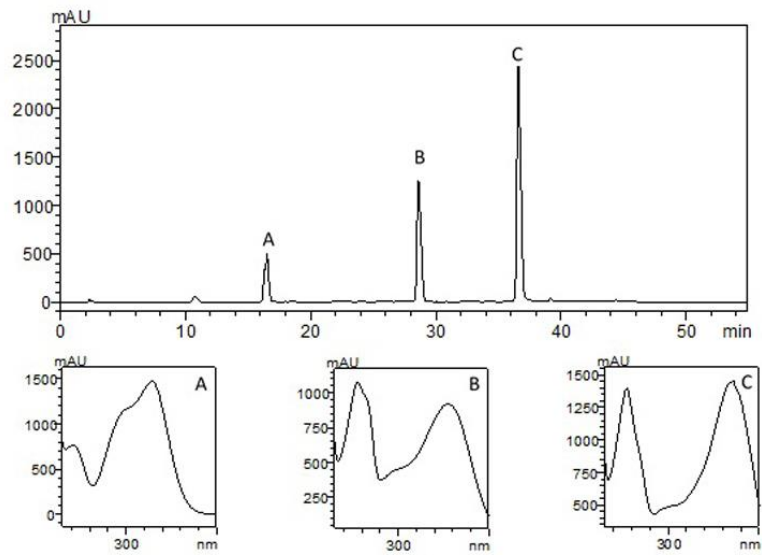


FIGURE 1: Chromatographic profile by HPLC-DAD, at a wavelength of 355 nm of chlorogenic acid standards (A) obtained in retention time of 16.5 min; rutin (B) with retention time of 28.6 min and quercetin (C), with retention time 36.5 min.

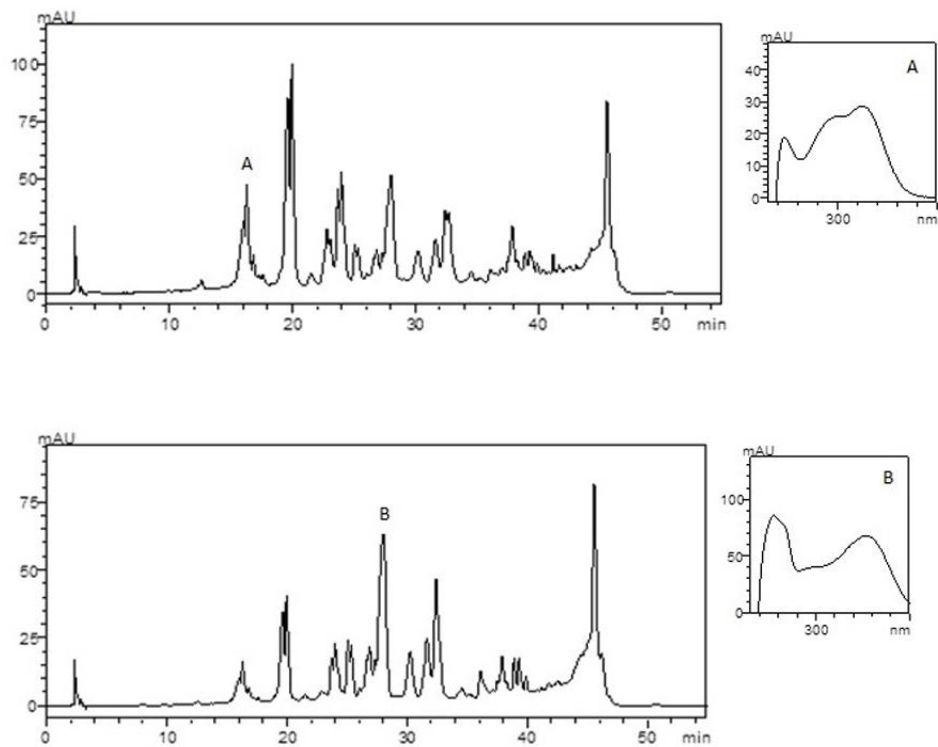


FIGURE 2: Chromatographic profiles obtained by HPLC-DAD, where it is possible to observe the presence of chlorogenic acid (A) at a wavelength of 327 nm and rutin (B) with a wavelength of 355 nm, in the crude extract of *Richardia brasiliensis* G., obtained from plants collected in winter.

The concentration of chlorogenic acid and rutin were calculated, obtaining the equation line, $y=167629x-352755$ with r of 0.9995 for the chlorogenic acid and, $y=43174x-80246$ with r of 0.9995 for the rutin.

The chlorogenic acid and rutin content identified and quantified in the CE, are reported in Table V.

TABLE V. Chlorogenic acid and rutin concentrations in *R. brasiliensis*, in crude extracts (CE) of the different seasons.

SAMPLES	SAMPLE CONCENTRATIONS (mg/mL)	CHLOROGENIC ACID (mg/g)	SAMPLE CONCENTRATIONS (mg/mL)	RUTIN (mg/g)
JA	5	1.621 ^d ± 0.05	1.25	25.122 ^b ± 0.06
AP	5	1.914 ^c ± 0.11	1.25	26.255 ^a ± 0.19
AG	5	3.214 ^b ± 0.03	1.25	13.328 ^d ± 0.62
OC	5	3.701 ^a ± 0.02	1.25	19.341 ^c ± 0.24

(JA): January; (AP): April; (AG): August; (OC): October;

Medians followed by similar letters do not differ by the Tukey test at 5% level.

The highest concentration of chlorogenic acid occurred in OC (3.701 ± 0.02) and AP the highest concentration of rutin (26.255 ± 0.19).

Samples (CE) were prepared at a concentration of 5 mg/ml and 1.25 mg/mL to measure chlorogenic acid and rutin respectively. For the analysis of rutin was necessary to dilute the samples, because due to its high concentration in CE *R. brasiliensis*, values extrapolated the points used in the preparation of the standard curve.

Medicinal properties attributed to species, may be related to this group of active substances in *R. brasiliensis*. Both constituents identified and quantified, are the polyphenols group of substances with great pharmacological importance because they have effective antioxidant, due to its free radicals scavenging properties, chelate metal ions by intercepting the active oxygen forming stable radicals, thereby protecting the tissues of these free radicals and lipid peroxidation (Wollgast and Anklan, 2000).

CONCLUSIONS

In the analysis of herbal drug, in different seasons, foreign matter and the percentage of water in the herbal drug, are within the recommended values by the Brazilian Pharmacopoeia. The swelling index signaled the presence of mucilaginous substances and the levels of total and acid-insoluble ash, showed high results when compared to other species. These values might be related to habitat type *R. brasiliensis*.

Regarding the dosages of active compounds, the extract obtained in the autumn, showed a higher yield (20.44%) and a higher concentration of flavonoids (28.9 mg/g), when quantified by spectrophotometer. This result was confirmed when rutin was quantified by HPLC-DAD, determining 26.25 mg/g.

In phytochemical screening, characterization colorimetric reactions were positive for groups of substances such as anthocyanin glycosides, tannins, amino groups, steroids and / or triterpenes, alkaloids, coumarins, flavonoids and organic acids, affirming other studies have determined that the presence of these composed of groups active in the species.

Based on the results, it is clear that the seasonal variation directly influence the quality of plant material and the concentration of active compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Authors would like to thank Dr^a Thais Scott do Canto-Dorow (UFSM) by the identification of the species and Prof. Dr^a Juçara Terezinha Paranhos (UFSM) by assistance with the statistical analyzes.

REFERENCES

AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Quim Nova**, v.26, n.5, p.763-765, 2003.

ALVES, R. M. S.; STEHMANN, J. R.; ISAIAS, R. M. S.; BRANDÃO, M. G. L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.14, n.1, p.49-56, 2004.

BARBEHENN, R. V.; JAROS, A.; LEE, G.; MOZOLA, C.; WEIR, Q.; SALMINEN, J. P. Hydrolyzable tannins as “quantitative defenses”: Limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar. **J Insect Physiol**, v.55, n.4, p.297-304, 2009.

BOLZANI, V. S.; YONG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomic and biological significance. **Recent Res Devel Phytochem**, v.5, p.19-31, 2001.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J of Agrl Food Chem**, v.52, p.3583-3589, 2004.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.16, n.2, p.170-177, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1982, 1032p.

COSTA, L. M.; CARVALHO, A. M.; PEREIRA, R. C.; DELPRETE, P. G.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, C. C.; KATO, L. Avaliação Fitoquímica e Atividade Biológica de *Spermacoce poaya* (Rubiaceae). In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENÇÃO DA UFG - CONPEEX, III, 2006, Goiânia. **Anais eletrônico do III Seminário de Pesquisa e Pós-graduação da UFG**. Goiânia. 2006.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Caracterização física, química e físico-química de extrato seco por

nebulização (*spray-dryin*) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Rev Bras Farm**, v.90, n.3, p.169-174, 2009.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v.9, n.2, p.135-141, 2001.

FARMACOPEIA Brasileira. 4ª ed. São Paulo: 1988. pt.1, p.V.4.2.3.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. Brasília: 2010. pt.1, p.192-204.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; PIMENTA, F. C.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZO, L. M. F. PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.30, n.2, p.193-196, 2009.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade da *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae). **Lat Am J Pharm**, v.29, n.2, p.192-197, 2010.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, n.1, p.35-39, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Boletim Agroclimatológico Mensal. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em: 15 janeiro 2015.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestre, aquáticas, parasitas e tóxicas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 440p.

MACEDO, J. M.; SOUZA, L. G. P.; VALENZUELA, V. C. T.; OLIVEIRA, A. B.; CASTILHO, R. O.; JÁCOME, R. L. R. P. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.34, n.4, p.585-590, 2013.

MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. Convolvulaceae. **Rev Bras Farmacogn**, v.20, n.1, p.18-22, 2010.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v.23, n.1, p. 123-132, 2005.

MORAIS, E. C.; NOGUEIRA, L. F. B.; LEITE, J. L. A.; LUCENA, L. S. M. A. B.; FIGUEIREDO, F. G.; GUEDES, G. M. M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. F. B. M.; LIMA, M. A.; SOUZA, F. H. T.; DIAS, C. S.; COUTINHO, H. D. M. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. **Indian J Tradit Know**, v.12, n.4, p.619-622, 2013.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Complanulaceae. **Tribuna Farm**, v.47, n.1, p.13-39, 1979.

OMS. Quality control methods for medicinal plant materials, 1998. p.122.

PINTO, D. S. **Primeiros estudos quimiotaxonômicos do gênero *Richardia*: fitoquímica da espécie *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2008. 145 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; SOUZA, F. H. T.; DIAS, C. S.; BRAZ-FILHO, R.; CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROSSETO, R.; PITELLI, R.M.; PITELLI, R.A. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: Poaia-Branca. **Planta Daninha**, v.15, n.1, 1997.

SANTOS, R. M.; OLIVEIRA, M. S.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. A variação sazonal no teor de fenóis de Folhas de *Eugenia uniflora* L. **Rev Bras Plantas Med**, v.13, n.1, p.85-89, 2011.

SCHOTT, P.C.; CANTO-DOROW, T.S. Benefícios potenciais de plantas daninhas: uma perspectiva de educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.4, n.4, p.524-529, 2011.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Rev Cubana Plant Med**, v.18, n.1, p.140-156, 2013.

SOUZA, F. H. T.; SILVA, T. S.; PINTO, D. S.; MONTES, R. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; DIAS, C. S. Nova cumarina isolada de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Fortaleza. **Anais** Químicos para uma potência emergente. Fortaleza, 2009.

SOUZA, F. H. T. **Estudos fitoquímicos e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 194 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v.14, n.2, p.137-144, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. Alemanha: Springer, 1996. 384p.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Res Int**, v. 33, n.6, p.449-459, 2000.