

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE
Randia ferox (Cham & Schlecht) DC.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lauren Pappis

**Santa Maria, RS, Brasil,
2015.**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO
EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Randia ferox*
(Cham & Schlecht) DC.**

Lauren Pappis

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

Orientadora: Prof.^a Dra.^a Liliane de Freitas Bauermann

**Santa Maria, RS, Brasil
2015.**

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

Pappis, Lauren

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. / Lauren Pappis.-2015.

64 f.; 30cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. *Randia ferox* 2. CLAE 3. toxicidade 4. genotoxicidade I. de Freitas Bauermann, Liliâne II. Título.

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

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO EXTRATO
BRUTO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Randia ferox* (Cham & Schlecht)
DC.**

elaborada por
Lauren Pappis

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

**Liliane de Freitas Bauermann, Prof.^a Dr.^a
(Presidente/Orientadora)**

Aline Augusti Boligon, Dr. ^a (UFSM)

Simone Pinton, Prof.^a Dr.^a (UNIPAMPA)

Santa Maria, 14 de dezembro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais
Eliomar e Lairane;
E em memória da professora
Margareth Linde Athayde.
A vocês todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por nunca me abandonar, ouvir e atender minhas orações.

Aos meus pais Eliomar e Lairane, por todo o amor, apoio e dedicação, por sempre me incentivarem ao estudo e ao crescimento pessoal e profissional. Ao meu pai, pelo exemplo de superação, força e por sempre se preocupar com meu bem estar. À minha mãe, por acreditar sempre em mim, nunca desanimar e ser essa fortaleza.

Aos meus irmãos Douglas e Lisiane, que me ensinaram a persistência e me deram exemplo nos estudos, sempre trocando experiências, se prontificando a me ajudar no que fosse preciso e por estarem sempre presente em todos os momentos da minha vida.

A minha sobrinha Isabela que, apesar da idade, respeitava meus horários de estudo e sempre me fez lembrar da importância da emoção sincera e da esperança.

Aos meus cunhados Andressa e Rosângelo, que perto ou longe torceram pelo meu sucesso e sempre me apoiaram nos momentos mais importantes.

A minha primeira orientadora Margareth, pela amizade, por sempre ter sido essa mãezona de coração gigante e um exemplo de profissional, de força e bom humor. Obrigada por me acolher desde a iniciação científica. A saudade é enorme.

A minha atual orientadora Liliane, por ter me acolhido nos momentos em que eu mais precisei. Obrigada por esse coração enorme e por sempre estar presente.

Aos meus colegas e amigos do LabFito que auxiliaram na minha evolução.

Aos colegas do LaFex que me receberam de braços abertos e me ajudaram nesse trabalho.

A minha colega e amiga Letícia, por me ajudar durante essa caminhada e estar do meu lado em todos os momentos, sempre conseguindo me acalmar e dividindo os mais diversos momentos dessa jornada.

Aos meus amigos, que me apoiaram, torceram e comemoraram comigo cada conquista.

Ao Eugênio e a Janete que me cederam a espécie para a coleta do material vegetal, sempre me auxiliando e apoiando meu estudo.

Ao professor Michel Mansur Machado e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIPAMPA que ajudaram no engrandecimento deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria por todas as oportunidades de crescimento profissional e todas as oportunidades oferecidas durante o ensino médio, graduação e pós-graduação.

A FAPERGS pela bolsa.

O meu muito obrigada a todos que de alguma maneira me auxiliaram na minha formação, na confecção deste trabalho, me apoiaram ou torceram por isso.

“Um sonho sonhado sozinho é um sonho
Um sonho sonhado junto é realidade.”
(Raul Seixas)

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC.

AUTORA: LAUREN PAPPIS

ORIENTADORA: Dr.^a LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 14 de dezembro de 2015.

O uso de recursos naturais como fonte de medicamentos é uma cultura muito antiga entre a população humana. Devido à essa cultura, existe uma crença de que produtos naturais não causam danos à saúde. Porém, muitas plantas medicinais usadas no tratamento de diversas doenças, quando testadas e avaliadas apresentaram metabólitos tóxicos e causaram danos à saúde. A espécie *Randia ferox* é conhecida popularmente como “limoeiro-do-mato” e suas folhas são usadas como cicatrizante e anti-inflamatórias. O presente trabalho objetivou identificar e quantificar o metabólitos secundários usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliar a toxicidade aguda, subaguda e genotoxicidade. As folhas da planta foram maceradas em etanol (70%) por sete dias, com renovação do solvente. O macerado foi filtrado e o material concentrado em evaporador rotatório e posteriormente levado à estufa para obtenção do extrato bruto (EB). Na avaliação do EB no CLAE foi possível quantificar quercetina (6,85 mg/g), ácido clorogênico (6,38 mg/g), rutina (5,52 mg/g), quercitrina (2,71 mg/g), luteolina (1,93 mg/g) e ácido gálico (0,71 mg/g). Em relação a avaliação da toxicidade, tanto os ratos machos quanto as fêmeas tratadas com 2000 mg/Kg de EB não apresentaram mortalidade ou alterações bioquímicas e hematológicas, sendo classificados na categoria 5 (DL₅₀ 2000-5000 mg/Kg), de acordo com o Guia da OECD 423. No tratamento subagudo, os ratos *Wistars* machos e fêmeas foram divididos em grupos que foram tratados com água (grupo controle) e com EB nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg. O tratamento durou 28 dias. Não houve diferença significativa no ganho de peso e na quantidade ingerida de comida. No tratamento com as duas maiores concentrações, observou-se uma diminuição na lipoperoxidação, espécies reativas de oxigênio e proteína carbonil no fígado de ambos os sexos, demonstrando uma atividade antioxidante. Na concentração de 400 mg/Kg houve um aumento do dano no DNA, o que pode ser considerado um efeito tóxico dos metabólitos presentes no EB. Houve um aumento das espécies reativas de oxigênio no rim das fêmeas em todas as concentrações, porém não foi considerado uma atividade nefrotóxica pois não provocou a lipoperoxidação e nem alterou outros parâmetros bioquímicos marcadores de dano renal. Apesar do aumento de colesterol nos machos tratados com 200 e 400 mg/Kg de EB, não foi considerado uma hepatotoxicidade, pois está dentro dos valores de referências normais. As fêmeas obtiveram aumento na glicose nos dois grupos tratados com a maior concentração do EB, o que sugere uma variação hormonal já que o mesmo não ocorreu nos machos. Os estudos elucidaram algumas características fitoquímicas e antioxidantes descritas pela primeira vez para a espécie. O EB das folhas de *Randia ferox* apresentou uma atividade significativamente tóxica apenas na mais alta concentração do tratamento subagudo.

Palavras-chave: *Randia ferox*, CLAE, toxicidade, genotoxicidade.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

TOXICITY AND GENOTOXICITY ASSESSMENT OF THE LEAVES' CRUDE EXTRACT OF SPECIE *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC.

AUTHOR: LAUREN PAPPIS

ADVISER: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

Place and Date of the Defense: Santa Maria, December 14, 2015.

Around the world, the use of plants as means of medicinal source is an ancient costume. Mainly in developing countries, medicinal plants are the only choice of treatment. Besides, the population believes that by being natural products, medicinal plants are not a risk for health. However, several studies have proven that some plants used as medicine show toxicity levels that endanger human health. Of particular interest, the leaves of the popularly known as "limoeiro-do-mato", the specie *Randia ferox* from the Ruceaceae family, are used as anti-inflammatory and healing. The aim of this study was to quantify the secondary metabolic in HPLC method and assess the acute and sub-acute toxicity of the crude extract of bothleaves (CEL) and genotoxicity for that plant. In HPLC method, it was possible to quantify quercetin (6,85 mg/g), chlorogenic acid (6,38 mg/g), rutin (5,52 mg/g), quercitrin (2,71 mg/g), luteolin (1,93 mg/g), and gallic acid (0,71 mg/g). In acute toxicity, rats *Wistars* of both genders was treated with CEL in a concentration of 2000 mg/Kg. The animals were observed during 14 days without any animal death nor observed change of behavior. In addition, their food intake, body weight gain, biochemical and hematological parameters did not show differences in comparison with the control group. According to OECD Guidelines 423, the specie was classified as five category, with lethal dose estimated between 2000-5000 mg/Kg. In the sub-acute study, the *Wistars* rats of both genders were treated during 28 days, separated in four groups, as follows: control group treated with water; and treatment groups where CEL was administrated in different concentrations (100, 200 and 400 mg/Kg). There was no significant difference of weight neither in the ingestion of food of the animals. The rat's blood was biochemically and hematologically evaluated. Besides, all livers and kidneys were analyzed for toxicity and genotoxicity parameters. The both genders of 200 and 400 mg/Kg showed a decrease of TBARS, ROS and PC in the livers, which may imply an antioxidant capacity of CEL. The DNA CA increased in both genders at 400 mg/Kg in the livers, wich may suggest a genotoxicity capacity. In the kidneys of all female of the groups treated with CEL, an increase of ROS was observed. However, TBARS and other kidney's damage markers did not show any difference from the control group. Such results suggest the absence of nephrotoxicity. A decrease of CHO occurred in the male rats treated with 200 and 400 mg/Kg, but the values laid within the reference dates, therefore such decrease was not due to a hepatotoxicity. In female treated with CEL in 200 and 400 mg/Kg, increase of GLU occurred. As the same did not happen with the males, those altered values suggest a hormone variation. The treatment sub-acute of CEL of *Randia ferox* showed a toxicity capacity only in the highest concentration.

Keywords: *Randia ferox*, HPLC, toxicity, genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Randia ferox</i> (Cham & Schlecht) DC. – aspecto geral da planta. Imagem obtida em seu local de coleta (Arroio do Tigre, RS).....	17
Figura 2 – Estrutura do ácido clorogênico.....	20
Figura 3 – Estrutura da quercetina (a), estrutura da rutina (b).....	21

CAPÍTULO 1

Figure 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of <i>Randia ferox</i>	37
Figure 2 - Lipid Peroxidation in liver of <i>Wistars</i> rats after 28 day of treatment with <i>Randia ferox</i> crude extract.....	39
Figure 3 – Reactive oxygen species in the liver of <i>Wistars</i> rats after 28 days of treatment with <i>Randia ferox</i> crude extract.....	39
Figure 4 – DNA comet assay damage presents after 28 days of treatment with <i>Randia ferox</i> crud extract in both genders.....	40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 - Composition of <i>Randi ferox</i> crude extract.....	37
Table 2 - Effects of the acute administration of <i>Randia ferox</i> crude extract on food intake and body weight gain of male and female <i>Wistars</i> rats.....	38
Table 3 – Effects of sub-acute treatment with <i>Randia ferox</i> on the liver and kidney parameters on male rats.....	41
Table 4 – Effects of sub-acute treatment with <i>Randia ferox</i> on the liver and kidney parameters on female rats.....	42
Table 5 - Effects of sub-acute treatment with <i>Randia ferox</i> on biochemical parameters in male and female rats.....	43
Table 6 – Effects of sub-acute treatment with <i>Randia ferox</i> on hematological parameters in male and female rats.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 FAMÍLIA RUBIACEAE	15
3.2 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>RANDIA FEROX</i> (CHAM & SCHLECHT) DC.....	16
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	18
3.3.1 <i>Definição, função e importância</i>	18
3.4 TOXICIDADE.....	21
3.4.1 <i>Toxicidade de Plantas Medicinais</i>	21
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	22
4 RESULTADOS	26
MANUSCRITO 1	26
1 INTRODUCTION	28
2 MATERIALS AND METHODS.....	29
2.1 PLANT MATERIAL.....	29
2.2 EXTRACT PREPARATION	29
2.3 CHEMICAL, APPARATUS AND GENERAL PROCEDURES	29
2.4 QUANTIFICATION OF COMPOUNDS BY HPLC-DAD	30
2.5 ANIMALS.....	31
2.6 ACUTE TOXICITY STUDY.....	31
2.7 SUB-ACUTE TOXICITY STUDY.....	32
2.8 BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS	32
2.9 LIPOPEROXIDATION	33
2.10 REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)	33
2.11 DNA COMET ASSAY	34
2.12 PROTEIN CARBONYL	34
2.13 CATALASE ACTIVITY	34
2.14 SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY.....	35
2.15 MICRONUCLEUS TEST.....	35
2.16 TOTAL PROTEIN	35
2.17 STATISTICAL ANALYSIS	36
3 RESULTS	36
3.1 HPLC ANALYSIS	36
3.2 ACUDE TOXICITY STUDY	37
3.3 SUB-ACUDE TOXICITY STUDY	38
4 DISCUSSION	44
5 CONCLUSION	48
REFERENCES	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos fazem uso de plantas para a sua sobrevivência desde o início da sua existência, utilizando-as como abrigo, alimento, no alívio de dores ou cura de algumas enfermidades (OLIVEIRA; MENINI NETO, 2012, p. 311). O uso de plantas como forma de tratamento é uma prática cultural perpetuada através de gerações e, mesmo com o crescimento no estudo, é uma terapia muitas vezes baseada apenas no conhecimento popular (ALVIM, et. al, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), qualquer planta que possua, em um ou mais órgãos, substâncias com propriedades terapêuticas e capazes de serem utilizadas na síntese de medicamentos na indústria farmacêutica é considerada planta medicinal (LIMA et. al, 2010, p. 163).

No final do século XIX, através do avanço tecnológico, houve uma nova fase no uso de plantas medicinais, onde as substâncias de ação farmacológica foram isoladas e, progressivamente, foram substituindo o uso de alguns extratos de ervas. Ainda nos dias de hoje, podemos observar muitas classes de fármacos cujo princípio ativo é isolado ou derivado de metabólitos de plantas, como exemplo desses temos a aspirina, morfina, efedrina e digoxina. A maioria desses compostos derivados de plantas foram descobertos através de estudos etnofarmacológicos, que são estudos baseados na cultura popular de plantas medicinais (GILANI; RAHMAN, 2005, p. 43-44).

Há um crescente aumento no uso e estudo de produtos com origem natural (ROMERO; CASTELLA, 2012, p. 149). Desde a década de 70, há um maior estímulo por parte da OMS para a pesquisa com plantas medicinais. Sendo assim, maiores estudos para comprovação de segurança, eficácia e qualidade estão sendo necessários. Muitas plantas de diversos países vêm sendo estudadas e tendo sua terapêutica e eficiência comprovada ou desconsiderada (RICARDO, 2015, p. 399).

No Brasil, a cultura popular no uso de plantas medicinais é bastante difundida e (SIMÕES, et. al., 2010, p. 821) ainda há uma parte da população brasileira que possui como única fonte de recurso terapêutico o uso de plantas medicinais. Há uma estimativa de que metade das espécies nativas possuem alguma atividade

farmacológica. Entretanto, apenas 1% dessas espécies já foram estudadas devidamente (MESSIAS, et. al, 2015, p. 77).

Considerando o conceito tradicional sobre plantas e no intuito de estabelecer diretrizes na atuação do governo, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, onde foi autorizada a inserção de tratamentos alternativos no Sistema Único de Saúde (SUS), facilitando o acesso dos pacientes às plantas medicinais e fitoterápicos previamente estudados e identificados. Essa política foi implementada através do Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006 com o intuito de ampliar as opções terapêuticas dos usuários do SUS, dando a eles maior segurança, qualidade e eficiência no uso dessas terapias e, assim, promovendo também o desenvolvimento da tecnologia e pesquisas, estimulando a indústria farmacêutica brasileira nessa área de interesse (BRASIL, 2006).

Segundo a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é considerado fitoterápico o medicamento obtido através de matérias-primas ativas de plantas medicinais, cuja segurança e eficácia foram comprovadas através de estudo científico e usado para fins de cura, profilaxia ou paliativamente. O medicamento fitoterápico não pode ser obtido de substâncias isoladas ou altamente purificadas e, mesmo sendo uma substância extraída de planta, não pode ser obtido sinteticamente. Essa RDC tem como base garantir a melhor qualidade no produto fitoterápico abrangendo os cuidados na coleta do material, avaliação do produto final, composição da formulação e comprovação da eficácia e segurança (ANVISA, 2014).

Apesar do avanço nos estudos e nas legislações para o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, a maioria das pessoas associam a origem natural dos produtos com baixa toxicidade e isenção de interações com medicamentos alopáticos (OLIVEIRA; LUCENA, 2015, P. 407). Essa crença de inocuidade é considerada errônea, pois apesar da origem, as plantas medicinais e fitoterápicos são xenobióticos e sofrem biotransformação no metabolismo humano, podendo formar produtos tóxicos ou que interajam com outras terapias (OLIVEIRA; MACHADO; RODRIGUES, 2014, p.33).

Entre as plantas utilizadas na medicina popular, encontra-se a espécie *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. que pertence à família Rubiaceae, conhecida popularmente como limoeiro-do-mato e com localização geográfica na região Centro-Sul do Brasil. Esta planta é utilizada principalmente como cicatrizante e anti-

inflamatória (LEONHARDT, et. al, 2008, p. 161-162). Diante das amplas indicações terapêuticas pela medicina popular para o uso da espécie *Randia ferox* e da escassez de estudos que comprovem sua eficácia e segurança, motivou-se a realização deste trabalho para a maior compreensão sobre seus constituintes químicos e possíveis efeitos tóxicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral realizar a identificação e quantificação dos metabólitos presentes no extrato bruto das folhas, analisar a capacidade toxicológica aguda e subaguda e também a genotoxicidade do extrato bruto das folhas da espécie *Randia ferox* (Cham. & Schlecht) DC.

2.2 Objetivos Específicos

- Delinear o perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas da espécie por meio de Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a toxicidade aguda *ex vivo* do extrato bruto das folhas da espécie *R. ferox* através do Guia OECD 423;
- Avaliar a toxicidade subaguda *ex vivo* do extrato bruto das folhas da espécie *R. ferox* de acordo com o Guia OECD 407;
- Avaliar modificações no ganho de peso e na alimentação após o tratamento agudo e subagudo com o extrato bruto das folhas de *R. ferox*;
- Avaliar modificações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos após o tratamento *ex vivo* subagudo com o extrato bruto das folhas de *R. ferox*;
- Avaliar o perfil da lipoperoxidação através dos métodos de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a formação de proteína carbonil.
- Avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio.
- Avaliar os marcadores enzimáticos antioxidantes do fígado e rim após o tratamento *ex vivo* subagudo com o extrato bruto das folhas de *R. ferox*;
- Avaliar a genotoxicidade das células do fígado e rim após o tratamento *ex vivo* subagudo com o extrato bruto das folhas de *R. ferox*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Rubiaceae

O nome da família Rubiaceae deriva do gênero *Rubia* Linnaeus (1753). *Rubia*, do latim *rubium*, que se refere ao nome da tinta vermelha que é extraída das raízes das plantas desse gênero e que era utilizada para tingir tecidos (DELPETRE; SMITH; KLEIN, 2004, p.20). A família Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas do mundo, com cerca de 650 gêneros e mais de 13.000 espécies, ela ocorre em todas as regiões do mundo, mas principalmente nas áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, há cerca de 110 gêneros e 2.000 espécies, destacando-se como uma das principais famílias da nossa flora e como um importante elemento das formações naturais (DELPETRE; SMITH; KLEIN, 2004, p.22; TAYLOR; CAMPOS & ZAPPI, 2007, p. 551; MARGALHO; da ROCHA; SECCO, 2009, p. 304).

Essa família é representada por árvores, arbustos e ervas e consta de quatro subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Ixoroideae (PEREIRA; BARBOSA, 2004, p. 305). Fazem parte da subfamília Rubioideae todas as espécies de plantas que possuem cristais de oxalato de cálcio (ráfides) presentes no vacúolo da célula vegetal (BREMER; MANEN, 2000, p. 44). A subfamília Cinchonoideae é constituída de árvores de grande porte e arbustos, possui frutos secos que se abrem na maturação e o corola das flores é contorto (prefloração). E a subfamília Antirheoideae possui espécies lenhosas, com frutos carnosos e corola raramente contorto (PEREIRA, BARBOSA, 2004, p. 311 e 307). A subfamília Ixoroideae tem como principal característica a apresentação secundária de pólen, ou seja, o pólen fica disponível para os agentes polinizadores antes do botão de flor abrir totalmente, frutos carnosos e cada sépala é recoberta pela anterior (prefloração contorcida) (ANDREAZEN; BREMER, 2000, P. 1731; ALVINO; MACHADO; QUIRINO, 2007, p,1; MENEZES, et. al., 2004; ROQUE; BAUTISTA, 2008, p. 41).

Essa família tem uma importância cultural, terapêutica e econômica, nela encontram-se a espécie *Coffe arabica* (café), uma bebida popularmente apreciada e

fonte de substâncias farmacologicamente ativas, como a cafeína (PEREIRA, 2007, p. 14), a *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), utilizada na fabricação de fitoterápicos e na medicina popular no tratamento de úlceras, artrite e com atividades cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, imunoestimulante, antiviral, antibacteriana e antifúngica, entre outras propriedades (MORAES, et. al., 2015, p. 08). O alcaloide quinino é extraído da casca das espécies do gênero *Cinchona*, esse alcaloide foi muito utilizado no tratamento da malária até ser substituído por drogas sintéticas. Além do tratamento para a malária, o extrato das cascas dessas espécies também possui propriedades anticâncer, fungicida, germicida e analgésico (YEBOAH; YEBOAH; SINGH, 2011, p. 1726). No gênero *Cephaelis* Sw, destaca-se *C. ipecacuanha* (Brot.) Rich (ipeca), produtora do alcaloide emetina, que é usada farmacologicamente como emético (DE SÁ; ELISABETSKY, 2012, 765).

Através de estudos fitoquímicos foi comprovada uma grande variedade de metabólitos secundários presentes em algumas espécies dessa família, como iridóides (MOURA, et. al., 2006, p. 452), cumarinas, terpenos (MORENO, et. al., 2014, p. 81), antraquinonas (LING, et. al., 2002, p. 1035), alcaloides (YEBOAH; YEBOAH; SINGH, 2011, p. 1726), derivados fenólicos e flavonoides (MAI, et. al., 2015, p. 94), sendo que a maioria dos metabólitos encontrados possuem propriedades farmacológicas. Devido a essas propriedades e a presença de diversos metabólitos, as espécies dessa família são comumente utilizadas na cultura popular e na produção de fitoterápicos.

3.2 Descrição da Espécie *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC.

A espécie *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. popularmente conhecida como limoeiro-do-mato é uma arvoreta de 3-7 metros de altura, espinhosa, com flores brancas e aromáticas e frutos amarelados ou alaranjados. No Brasil, possui distribuição geográfica do Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Devido a problemas de identificação o limoeiro-do-mato é amplamente referido como *Randia armata* (Sw) DC., sendo assim, considerada uma sinonímia botânica (LEONHARDT, et. al., 2008, p. 161).

Esta espécie (Figura 1) é popular e mundialmente utilizada como alimento e também como planta medicinal para o relato de várias queixas. Suas folhas e raízes são utilizadas para o combate da gonorreia e suas raízes para combater cansaço e falta de ar (ERBANO, 2010). Segundo Noelli (1998, p. 192) os Índios Guaranis empregam a planta como cicatrizante, no Nordeste brasileiro ela é usada no tratamento de doenças inflamatórias (ERBANO, 2010, p.28).



Figura 1. *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. – aspecto geral da planta. Imagem obtida em seu local de coleta (Arroio do Tigre, RS).

De acordo com Erbano (2010, p.28) foram feitas investigações com o extrato bruto das folhas e descobriu-se ação antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Soares e colaboradores (2006) confirmaram a ação antimicrobiana desta planta, e entre as cepas estudadas houve ação contra oito cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Além das atividades já citadas as folhas da espécie também possui atividade antioxidante (VIEIRA et al., 2005) e possui aplicação na indústria de cosméticos (PAULY, FLEURY, 1999). Segundo Pauly e colaboradores (1999) na indústria são feitas várias formulações de cremes, com uma mistura de extratos de diferentes

plantas, uma dessas formulações, contendo a *Randia ferox* possui atividade contra as enzimas colagenases, radicais livres e raios ultravioletas do tipo B, porém não se sabe a qual espécie, ou se é a associação delas que contribui com esse potencial anti-idade.

3.3 Metabólitos Secundários

3.3.1 Definição, função e importância

A presença de atividade metabólica é uma característica presente nos seres vivos. O metabolismo ocorre no interior da célula e é formado por um conjunto de reações químicas e enzimáticas. No organismo vegetal, o metabolismo é dividido em primário e secundário. É considerado metabolismo primário todos os processos metabólicos essenciais dos vegetais como fotossíntese, respiração celular e transporte dos solutos. Como esses processos são necessários para a sobrevivência dos vegetais, os metabólitos primários estão presentes em todos vegetais. Ao contrário do metabolismo primário, o secundário não é essencial à planta, por isso diferentes espécies podem produzir diferentes metabólitos secundários. Geralmente, a presença de metabólitos secundários está relacionada a sobrevivência e reprodução da espécie (SIMÕES, et. al., 2010, p. 403).

Embora os metabólitos secundários não sejam necessários no ciclo de vida de uma planta, eles desempenham um papel importante na interação da planta com o meio ambiente. São esses metabólitos que protegem as plantas contra herbívoros, ataque de patógenos, atração de animais polinizadores e dispersores de sementes. Além de ajudar nos fatores bióticos já citados, eles podem ajudar também contra alguns fatores abióticos, como mudanças de temperaturas, proteção contra raios UV, deficiência de algum nutriente e conteúdo de água (SIMÕES, et. al., 2010, p. 404).

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são considerados uma das principais e mais abundante classe de metabólitos secundários presentes nas plantas, sendo produzidos em resposta à condições de estresse como radiações e infecções. Na planta, esses compostos podem apresentar diferentes

funções como pigmentação, contribuição para os mecanismos antioxidantes e de proteção contra a poluição atmosférica, ferimentos e temperaturas elevadas (NACZK; SHAHIDI, 2006, p. 1523, 1524). No organismo humano, eles são absorvidos através de frutas e vegetais, sendo uma grande fonte exógena de substâncias antioxidantes como, por exemplo, o ácido cafeico, ácido clorogênico e o ácido felúrico. Devido a esse alto poder antioxidante, os polifenóis possuem ação fisiológica como anti-inflamatória, antitrombótica, cardioprotetora, vasodilatadora, entre outras (BALASUDRAM; SUNDRAM; SAMMAM, 2006, p. 191; SIMÕES, et. al., 2010, p. 528).

Os polifenóis são substâncias simples ou complexas que contêm ao menos uma hidroxila substituindo um hidrogênio do anel aromático, as demais substituições e seus constituintes, além de gerar inúmeras substâncias diferentes, levam também a diferentes propriedades e/ou funções dos metabólitos na planta (BALASUDRAM; SUNDRAM; SAMMAM, 2006, p. 192). Um exemplo de polifenol é o ácido gálico (Figura 2) que é um derivado do ácido benzoico e possui três hidroxilas ligadas ao anel aromático como pode-se observar na Figura 2 (SIMÕES, et. al., 2010, p.522), no organismo humano esse ácido possui a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica, podendo auxiliar na prevenção doenças cardiovasculares (NAVARRETE; VIDAL; LAHUERTA, 2008, p. 66).

Outro polifenol é o ácido clorogênico (Figura 2) que é derivado de ácidos fenólicos (SIMÕES, et. al., 2010, p. 523), este polifenol é conhecido pelo seu poder antioxidante e quelante (SIMÕES, et. al., 2010, p. 528), estudos demonstram que o ácido clorogênico também possui atividade antiagregante plaquetária (PIERDONÁ, et. al.; 2014, p. 154), diminui a pressão arterial em pacientes hipertensos (VON WICHTMANN, 2009, p. 634) e a absorção de glicose (ROJO-MARTINEZ, et. al.; 2005, p. 560). Devido a sua diversidade estrutural, os compostos fenólicos são divididos em grupos, são eles: flavonoides, taninos condensados, antraquinonas, xantonas, ligninas e derivados da cumarina (BALASUDRAM; SUNDRAM; SAMMAM, 2006, p. 192).

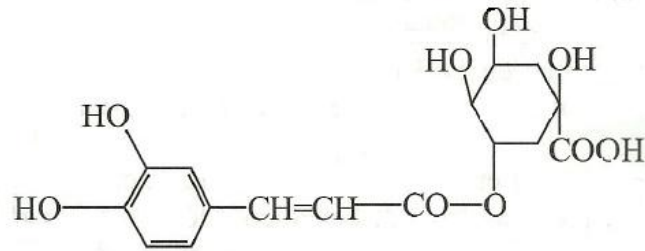


Figura 2. Estrutura do ácido clorogênico (SIMÕES, et. al., 2010, p. 523).

Um grupo de origem natural de grande importância e diversidade estrutural são os flavonoides. Devido a essa diversidade, os flavonoides são divididos em diferentes classes, como: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, antocianos, entre outros (SIMÕES, et. al.; 2010, p. 577-580). Esses compostos possuem uma grande atividade biológica como antitumoral, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antimicrobiana e muitas outras atividades ligadas às suas estruturas (SIMÕES, et. al., 2010, p. 607).

Um flavonoide muito abundante na natureza é a quercetina (Figura 3), que é da classe dos flavonóis e é capaz de diminuir *in vitro* o aumento de células leucêmicas (WALTER, et. al., 2000, p. 332; SIMÕES, et. al.; 2010, p. 582), outro estudo *n vitro* mostrou que a quercetina ajuda a induzir a apoptose das células de câncer pulmonar e não apresenta atividade contra as células saudáveis (CABRERA; MACH; 2012, p. 149). Ela também possui atividade anti-inflamatória, antitrombótica, anti-hipertensiva, quelante de metais e modula algumas enzimas antioxidantes (DAJAS, et. al.; 2015, p. 141).

A rutina (Figura 3), que também pertence à classe dos flavonóis, é outro flavonoide conhecido e estudado pelas suas atividades farmacológicas. Alguns estudos demonstram que a rutina possui a sua capacidade de diminuir a permeabilidade capilar, sendo usada no tratamento da insuficiência venosa crônica, ela é também antioxidante, atua diminuindo a agregação plaquetária, é anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e também ajuda a prevenir algumas doenças crônicas como artrite, câncer, diabetes e hipertensão, entre outras atividades (SIMÕES, et. al.; 2010, p. 582; KICEL, et. al., 2015, p. 86; KAMEL; MOSTAFA, 2015, p. 59).

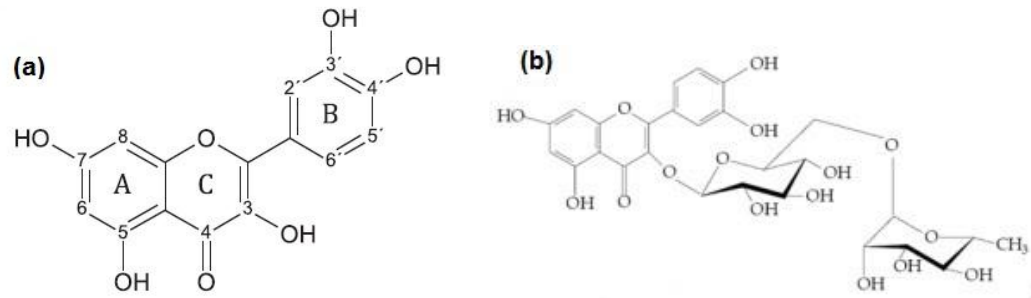


Figura 3. (a) estrutura da quercetina (DAJAS, et. al., 2015, p.141). (b) estrutura da rutina (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009, p. 22).

Um amplo grupo de metabólitos secundários são os alcaloides, que são encontrados predominantemente em angiospermas e são formados principalmente através de reações com aminoácidos. Não há um aminoácido padrão para a sua formação, cada classe de alcaloide é formado por um diferente aminoácido, são eles: tirosina, triptofano, lisina, histidina, glutamina, ácido aspártico, glicina, entre outros. Há também os pseudoalcaloides, nos quais há a incorporação de terpenos ou esteroides na sua molécula final (SIMÕES, et. al., 2010, p. 766, 772).

Como os alcaloides tem várias rotas metabólicas para a sua formação, eles possuem estruturas diferentes entre si e, por consequência, diversas atividades biológicas. Entre suas atividades documentadas podem-se citar: antimalárico, antitumoral, anticolinérgico, antitussígeno, analgésico, diurético, cardiotônica, antibacteriana, psicoestimulante, amebicida, entre outros (SIMÕES, 2010, p. 787; ZHANG, et. al., 2015, p. 31; CHENG, et. al., 2015, p. 8601).

3.4 Toxicidade

3.4.1 Toxicidade de Plantas Medicinais

Em algumas comunidades as plantas medicinais são os únicos recursos disponíveis para tratamento (RIBEIRO, et. al., 2014, p. 913). Na maioria das vezes, essas plantas utilizadas não possuem um estudo adequado no qual comprovem sua eficácia, segurança e qualidade (RICARDO; GOULARTE; BRANDÃO, 2015, p. 399).

Apesar da falta de estudos, a população continua usando as plantas medicinais devido à crença popular de que o que é natural não causa danos à saúde (LANINI, et. al., 2009, p. 121). Porém, assim como o uso de medicamentos, o uso de plantas em tratamentos também pode causar reações adversas e apresentar toxicidade em alguns órgãos e sistemas (GOMES et al., 2012, p.481). As plantas medicinais podem desencadear algumas reações adversas devido ao uso simultâneo com medicamentos, interação com alimentos e devido aos seus próprios constituintes (BALBINO, DIAS, 2010, p. 992). Por esses motivos, torna-se importante o estudo sobre a toxicidade de plantas usadas na medicina popular, para a elucidação de seus possíveis efeitos tóxicos e seus efeitos farmacológicos (GOMES et al., 2012, p. 481).

Deve-se considerar, do ponto de vista toxicológico, os efeitos a longo prazo que os tratamentos com plantas medicinais podem causar e não somente o efeito imediato de alívio de sintomas e/ou cura. Pois alguns xenobióticos podem apresentar toxicidade hepática, renal e cardiovascular (SIMÕES, et. al., 2010, p. 249; RICARDO; GOULARTE; BRANDÃO, 2015, p. 399). O confrei (*Symphytum officinale* L.) era usada na cultura popular para tratar fraturas nos ossos, úlceras gastrointestinais e problemas de evacuação intestinal, mas estudos mostraram que ela apresenta hepatotoxicidade em humanos e é carcinogênica em animais experimentais, causando adenomas e sarcomas no fígado dos ratos testados (MEI, et. al., 2005, p. 873).

De acordo com o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), em 2012 no Brasil foram notificados 1185 casos de intoxicações com plantas, sendo que um deles levou a óbito, apresentando uma letalidade de 0,08%, sendo que a região Sudeste apresentou o maior número de casos, totalizando 544 e foi a região que ocorreu o óbito (SINTOX, 2012). Por isso, não se pode levar em consideração somente o uso popular para validar eticamente as plantas medicinais como eficazes e seguras, é necessário dados experimentais que comprovem os possíveis riscos para quem se expõe ao tratamento (SIMÕES, 2010, p. 249).

3.5 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante

O oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons na respiração aeróbica, formando como produto final água. Há muitas vias do metabolismo aeróbico onde

pode ser citada a presença do oxigênio com essa finalidade, são elas: cadeia respiratória na mitocôndria, via da xantina oxidase, nas células fagocíticas e na síntese de prostaglandinas, entre outras. A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como produto final desse metabolismo é considerado um processo fisiológico normal e, até mesmo, essencial, como é o exemplo da formação do radical superóxido em células fagocíticas, que através de reações endógenas origina o ácido hipocloroso que apresenta função bactericida (RIBEIRO, et al., 2005, p. 16).

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer substância química que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. A formação desses compostos é devido a perda ou ganho de elétrons em qualquer um dos orbitais, tornando-os desemparelhados. Porém, em sua maioria, os radicais livres não apresentam interações patológicas com os organismos, os radicais que empregam essas interações são as ERO, como por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e superóxido (O_2^\cdot). Os ERO são altamente reativos e capazes de atacar moléculas biológicas, e sua formação ocorre a partir de substâncias endógenas que possuem metabolismo do oxigênio (FERREIRA, MATSUBARA, 1997, p. 61).

Células de organismos animais estão constantemente ameaçadas pela ação dos ERO e seus possíveis danos. Os danos causados por eles ainda não foram completamente elucidados, porém alguns estudiosos acreditam que seu principal mecanismo é a lipoperoxidação (LPO). Através deste mecanismo, os radicais podem causar danos irreversíveis à membrana da célula, causando mudanças nos transportes de íons, liberação do conteúdo organelas, liberação das enzimas lisossômicas e formando substâncias citotóxicas como o malonaldeído (MDA), resultando em morte celular. A LPO está relacionada a processos de envelhecimento, cânceres e a toxicidade de xenobióticos. Apesar de estar muitas vezes relacionada a processos patológicos, a LPO também possui importância fisiológica, por exemplo, seus produtos são importantes em respostas inflamatórias (FERREIRA, MATSUBARA, 1997, p. 63; ANHORLD, HECK, 2014, p.2).

Quando ocorre um excesso de agentes oxidantes, o sistema endógeno de defesa antioxidante não consegue detoxificar todos ERO formados. Esse desequilíbrio que ocorre resulta em excesso de ERO, também chamado de estresse oxidativo. Uma das principais consequências é a LPO e seu produto tóxico MDA. Uma análise utilizada para quantificar esse produto tóxico é o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ANHORLD, HECK, 2014, p.1). Outra consequência do

estresse oxidativo é a oxidação de proteínas, que ocorre através de inserção de um radical carbonil em sua estrutura molecular. O teor resultante dessa carbonilação (proteína carbonil – PC) é amplamente utilizado como indicador de oxidação proteica (CARVALHO, 2012, p. 6).

Para mimetizar os danos causados pelos ERO, o organismo possui defesas antioxidantes endógenas. Um dos mecanismos de defesa consiste em detoxificar os agentes antes deles causarem a lesão, são elas as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997, p. 64). O radical superóxido é extremamente reativo e pode causar danos nos lipídeos, enzimas e no DNA (NELSON, COX, 2006, p. 715), a enzima SOD reage com esse radical e o transforma em peróxido de hidrogênio. O mecanismo de ação da enzima CAT é converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, colaborando para evitar o estresse oxidativo (FERNANDES, et. al., 2013, p. 9).

Além das defesas endógenas, estudos sugerem que a ingestão de defesas exógenas são essenciais para o combate aos radicais livres. Esses antioxidantes exógenos são obtidos, principalmente, através da alimentação com produtos vegetais, sendo os principais: ácido ascórbico, compostos fenólicos e carotenoides. Porém, muitos compostos encontrados nos vegetais podem ter mecanismos pró-oxidantes, ou seja, eles podem estimular a oxidação. Esse potencial depende da molécula, concentração e da célula atingida (SIMÕES, 2010, p. 528).

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta os resultados em forma de manuscrito (manuscrito 1).

Além disso, essa dissertação contempla os itens considerações finais, no qual os resultados são interpretados, conclusões e referências bibliográficas, as quais são relativas as seções de introdução, revisão bibliográfica e considerações finais.

4 RESULTADOS

MANUSCRITO 1

Toxicity and genotoxicity assessment of the crude extract of *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. leaves

Lauren Pappis, Andreia Regina Haas da Silva, Letícia Teixeira Nunes, Camille Gaube Guex, Natália Jank Mossmann, Mariana Piana, Raul Oliveira Souza, Luís Flávio Souza de Oliveira, Michel Mansur Machado, Liliane de Freitas Bauermann.

Toxicity and genotoxicity assessment of the crude extract of *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. leaves

Lauren Pappis^{1*}, Andreia Regina Haas da Silva¹, Letícia Teixeira Nunes¹, Camille Gaube Guex², Natália Jank Mossmann³, Mariana Piana¹, Raul Oliveira Souza⁴, Luís Flávio Souza de Oliveira⁵, Michel Mansur Machado⁶, Liliane de Freitas Bauermann^{1*}.

¹ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

² Post-Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

³ Graduate student of Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

⁴ Graduate student of Pharmacy, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, Uruguaiiana, RS, 97500-970, Brazil.

⁵ Post-Graduate Program in Biological Science (Toxicology Biochemistry), Federal University of Pampa-UNIPAMPA, Uruguaiiana, RS, 97500-970, Brazil.

⁶ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, Uruguaiiana, RS, 97500-970, Brazil

*Correspondence to: Lauren Pappis, Department of Industrial Pharmacy of Federal University of Santa Maria, Campus Camobi, prédio 26, sala 1115. Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil. [telephone number +55 55 3220 9618; fax: +55 55 3220 8248; e-mail: laurenpappis@gmail.com].

ABSTRACT

Randia ferox, a native species of Brazil, is popularly known as "limoeiro-do-mato" and is used on the population in healing processes. The aim of this study is to assess the acute and subacute toxicity, besides the genotoxicity of the treatment with the crude extract of the leaves and quantify their compounds through the HPLC method. The toxicity studies were based on the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD-guidelines 423 and 407). In the acute toxicity study, a single dose of 2000 mg/Kg of *R. ferox* crude extract was administered orally in male and female rats. In subacute toxicity study, the extract was administered orally in male and female rats, with doses of 100, 200 and 400 mg/Kg/day during 28 days. The effects of the treatments on the rats were evaluated via the investigation of their biochemical and hematological structure, besides their body weight gain, food intake and behavior changes. Their livers and kidneys were tested for biochemical and genotoxicity parameters. In HPLC method, it was possible to quantify six phenolic compounds such as quercetin (6,85 mg/g), chlorogenic acid (6,38 mg/g), rutin (5,52 mg/g), quercitrin (2,71 mg/g), luteolin (1,93 mg/g) and gallic acid (0,74 mg/g)., is the first time that is identify and quantify this compounds for de specie. The acute administration of *R. ferox* did not change any tested parameter as well as did not cause mortalities. On the other hand, the subacute toxicity study caused a decrease of TBARS, ROS, and CP in liver, indicating an antioxidant capacity. An increase of DNA damage in the highest concentration in liver, inferred a genotoxicity propriety. In biochemical parameters, a decrease of the cholesterol was observed in the males, which is considered normal, and an increase of glucose in female, suggesting a hormone variation. Therefore, it was concluded that the plant has a low toxicity capacity.

1 Introduction

The tradition of plants as medicinal source is broadly known around the world (Parthiban, et. al., 2015). This tradition is an important factor to stimulate the photochemistry and pharmacologic study about the popular medicinal plants. Through this study, a great number of new pharmacologic actives substances have already been found. According to the World Health Organization (WHO), in development countries, the estimated is that 65-80% of population uses medicinal plants the only source of treatment about to some diseases (Saraiva, et. al., 2015). This dependence of natural sources is mostly connected to their low cost in comparison with allopathic medicine, and a geographic isolation of some cities (Bitu, et. al., 2015).

Brazil has one of the biggest biodiversity in the world and, because of this, has a great tradition as well as popular knowledge about medicinal plants (Carvalho et. al., 2014). They were introduced together with natural products in the Brazilian Public Health System (SUS) through the National Program on Medicinal Plants and Phytotherapy, as a program that has the goal to ensure the safety of approach of medicinal plants (Alerico, et. al., 2015).

Most of people believe that, as a natural product, medicinal plants have no toxicology propriety (Hübsch, et. al., 2014). However, some medicinal plants have been rationed with some toxic effects (Parra, et. al., 2001). Actually intending to protect themselves, plants create mechanisms of defense against predators in the course of their evolution, which yields production of some compounds with a low molecular weight, such as alkaloids, terpenoids and glycosides. Mostly, these compounds help in plants defenses by presenting toxic effects in animals (Dang, et. al., 2015).

The specie *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. is distribute in Midwest and South of Brazil, being popularly known as “limoeiro-do-mato”. Local population use the leaves of this plant in healing process (Leonhardt et. al., 2008). There is not yet studies about the toxicity of the leaves' extract. Therefore, the aim of this study was to investigate the toxicity acute and sub-acute, as the genotoxicity, in the crude extract of the leaves of the *Randia ferox* (Cham & Schlecht) DC. in rats through the biochemical and hematological parameters.

2 Materials and methods

2.1 Plant material

The leaves of *Randia ferox* for the investigation was collected in the town of Arroio do Tigre (Rio Grande do Sul, State of Brazil, coordinates 29° 19' 22''S and 53° 4' 35''W) in July 2014. The species was identified in the Department of Biology at Federal University of Santa Maria and the dried voucher specimen was archived and preserved under the registration number SMDB 13775.

2.2 Extract preparation

The leaves of the plant were dried in a stove at control temperature (40°C) and then powdered in a knife mill. The powder of the leaves was macerated with 70% ethanol at room temperature for one week, with daily agitation. After filtration, the extract was evaporated and concentrated under reduced pressure, in order to remove the ethanol. The aqueous extract was evaporated, in a stove, to dryness to obtain the crude extract of the leaves.

2.3 Chemical, apparatus and general procedures

All chemicals were of analytical grade. Methanol, phosphoric acid, gallic acid and chlorogenic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Rutin, quercetin, quercitrin and luteolin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto,

Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

2.4 Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles. The mobile phase with a flow rate of 0.5 mL/min consisted of a mixture of solvents: A (water/phosphoric acid, 98:2% v/v) and B (methanol/water, 70:30% v/v) using the following linear eluting gradient: 0-3 min: 0% B in A; 3-25 min: 30% B in A; 25-43 min: 50% B in A; 43-55 min: 60% B in A; 55-60 min: 80% B in A; 60-65 min: 50% B in A; and 65-69 min: 0% B in A; following the method described by Silva et al. (2014) with some modifications. Crude extract of *Randia ferox* was analyzed at a concentration of 15 mg/mL. The presence of six antioxidants compounds were investigated, namely, gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, quercitrin, luteolin and rutin. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The injection volume 15 µl and the wavelength were 270 nm for gallic acid, 327 nm for chlorogenic acid, and 365 nm for luteolin, quercitrin, quercetin and rutin. The samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.025 – 0.300 mg/ml. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 13472x + 1195.8$ ($r = 0.9997$); chlorogenic acid: $Y = 13087x + 1269.5$ ($r = 0.9999$); quercitrin: $Y = 12603x + 1356.7$ ($r = 0.9996$); luteolin: $Y = 11945x + 1348.1$ ($r = 0.9998$); rutin: $Y = 12765x + 1351.6$ ($r = 0.9999$) and quercetin: $Y = 12496x + 1254.8$ ($r = 0.9995$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Colpo et al. (2014). LOD and LOQ were

calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.5 Animals

Adult male and female Wistar rats (160-200g) were obtained of Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and they were arbitrarily distributed into different experimental groups. The animals were housed in the polypropylene cages at an ambient temperature $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 45 – 55% relative humidity, with a 12/12h light/dark cycle and they are also adapted to local conditions at least 72h before become the experiment. Animals were provided with commercial food pellets and water *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA UFSM; Protocol 079/2014).

2.6 Acute toxicity study

The acute oral toxicity of *Randia ferox* crude extract (RfCE) in Wistar rats was preconized to Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline (2001), with some modifications. The experimental procedures was fulfilled using 3 animals *Wistar* rats per group male and female (separated) at each step. The control group received distilled water (1 mL/Kg) and the test group a single dose of the crude extract of the plant with a dose of 2000 mg/Kg, corresponding to the maximum dose recommended by the protocol adopted. Both administrations were made by oral gavage. The animals was observed 6 and 12 hours after the treatment an everyday during 14 days. It was monitored some possible differences in the weight of the animals and food intake, occurrence of tremors, convulsions, changes in fur and skin, somatomotor activity and behavior, as well as cases of death. On day 15, after a short period of fasting, the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture.

On that, the blood was collected in two tubes: one with anticoagulant and another with none additive.

2.7 Sub-acute toxicity study

The sub-acute oral toxicity study was developed using the OECD 407 (1995) Guideline with some modifications. The RfCE was dissolved in water and administered by oral gavage for 28 days. The animals were divided in eight groups, totaling 40 (20 male and 20 female) used in the experiment (n=5), as follows:

Group I: control group treated with water.

Group II: treated with CEL 100 mg/Kg.

Group III: treated with CEL 200 mg/Kg.

Group IV: treated with CEL 400 mg/Kg.

The body weight and food intake was monitored each two days through the study period. On day 29, after a short period of fasting, the animals anesthetized and euthanized by cardiac puncture. On the cardiac puncture, the blood was collected in two tubes: one with anticoagulant and another with none additive. The kidney and the liver of each animal was removed and homogenized with sodium phosphate buffer 0,1M, pH 7,4.

2.8 Biochemical and hematological parameters

The blood without anticoagulant was allowed to clot before centrifugation (4000 rpm for 10min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cholesterol (CHO), glucose (GLU), creatinine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN) using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil).

The anticoagulated blood was analyzed immediately for the following hematological parameters: erythrocytes (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cells distribution width (RDW), protein (PRO), platelets (PLT) and leukocytes (WBC). All counts were determined by using an automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

2.9 Lipoperoxidation

The thiobarbituric acid reaction substance (TBARS) method (Berton et al., 1998) measured lipoperoxidation of livers and kidneys. In brief, the livers and kidneys samples were mixed, separately, with TBA reagent consisting of 0.375% TBA and 15% trichloroacetic acid in 0.25-N hydrochloric acid. In a water bath, the reaction mixtures were placed for 30 min and centrifuged at 1811g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 nm. MDA, a measure of lipid peroxidation, was calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5/\text{M cm}$. The results were expressed as $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein.

2.10 Reactive Oxygen Species (ROS)

The formation of ROS in cellules was measurement using DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) solution as the substrate (Mirhe, et al, 2003). The supernatant of the liver and kidney homogenized was incubate at 37°C and, after 1 hour, the DCFH-DA (5 μL) was added and the incubation continued more 1 hour in the dark ambient. The fluorescence was measurement for 488 nm for excitation and 525 nm for emission (LeBel, et al., 1992). The results were expressed in percentage.

2.11 DNA Comet assay

The comet assay is one of the most precise test of genotoxicity. Although there are other DNA damage tests, the comet assay (CA) is one of the most sensitive and accurate and is relatively free of technical artifact (Collins, 2009). We identified 100 cells in the slides that were submitted for analysis. The cells were visually scored according to tail length, with scores ranging from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The tests were carried out in triplicate, and the data are presented as mean \pm S.D.

2.12 Protein Carbonyl

When the protein oxidation occurs, there is a distinct increase of protein carbonyls. Here, protein carbonyl (PC) in liver and kidney microsomal were detected by spectrophotometric measurement, of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives ($\epsilon_{370 \text{ nm}} = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as described by Levine et al. (1990); since nitrotyrosine and hemin also absorb at 370 nm. Their spectral contribution was determined in samples not treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine and this value was subtracted from samples treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The results were expressed in nMol of carbonyl protein/mg of protein.

2.13 Catalase activity

Catalase (CAT) activity was measured according to the method of Aebi (1984). One unit of catalase was defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μM of H_2O_2 in 1 min. With the addition of 1.0 ml of freshly prepared 20 mM H_2O_2 , the reaction is initiated. The decomposition rate of H_2O_2 was measured

spectrophotometrically at 240 nm for 1 min. The enzyme activity was expressed as U/mg protein.

2.14 Superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase (SOD) activity was measured according to the method of McCord (1994). For the determination of SOD activity, xanthine and xanthine oxidase were used in order to generate superoxide radicals reacting with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride, aiming to form a red formazan dye. SOD activity was then measured at 505 nm. The results were expressed in uSOD/mg of protein.

2.15 Micronucleus test

In the micronucleus (MN) test, the cells were fixed with acetic acid and methanol (75:25, v/v), transferred onto clean microscope slides in duplicates, and then stained with 5% Giemsa. The criteria for scoring cells with MN were described in a previous report (Thomas et al. 2008). One thousand cells were counted for each sample, and the results were expressed as the micronucleus frequency per 1000 cells.

2.16 Total protein

Total protein contents were determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

2.17 Statistical analysis

The data are expressed as means \pm S.D. All the results were analyzed by one-way ANOVA, and Tukey test were used for the purpose to compare any significant differences between the control group and the therapeutic group. The significant differences between the groups were considered when $p < 0.05$. The HPLC statistical analysis was performed by using the free software R, version 3.1.1 (R Core Team, 2014).

3 Results

3.1 HPLC analysis

HPLC fingerprinting of *Randia ferox* crude extract revealed the presence of gallic acid ($t_R = 12.03$ min; peak 1), chlorogenic acid ($t_R = 36.17$ min; peak 2), rutin ($t_R = 53.28$ min; peak 3), quercitrin ($t_R = 56.76$ min; peak 4), quercetin ($t_R = 59.31$ min; peak 5) and luteolin ($t_R = 65.97$ min; peak 6) (Fig. 1 and Table 1). The HPLC analysis revealed that flavonoids (quercetin, quercitrin, rutin and luteolin) and phenolic acids (gallic and chlorogenic) are present in the crude extract of *Randia ferox*.

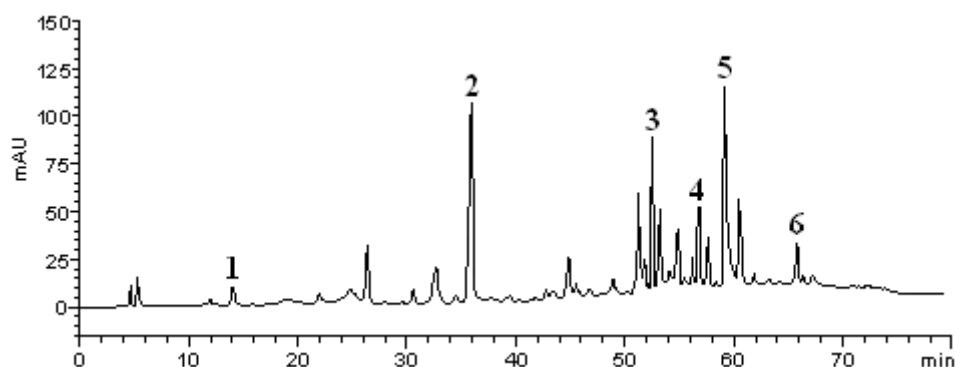


Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of *Randia ferox*. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), rutin (peak 3), quercitrin (peak 4), quercetin (peak 5) and luteolin (peak 6).

Table 1 – Composition of *Randi ferox* crude extract.

Compounds	<i>Randia ferox</i>		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	0.74 ± 5.77 ^a	0.07	0.028	0.089
Chlorogenic acid	6.38 ± 5.77 ^a	0.63	0.009	0.027
Rutin	5.52 ± 0.01 ^a	0.55	0.015	0.053
Quercitrin	2.71 ± 0.01 ^d	0.27	0.010	0.034
Quercetin	6.85 ± 0.01 ^b	0.68	0.016	0.048
Luteolin	1.93 ± 5.77 ^e	0.19	0.007	0.023

The results are expressed in mean ± S.D of three determinations. Averages followed by differences letters differ by Tukey test at $p < 0.05$. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

3.2 Acute toxicity study

The assessment of acute toxicity in female and male, after the administration of 2000 mg/Kg, showed no signs of mortality and morbidity. According to OECD 423, the RfCE must be included in category 5 and with LD₅₀ estimated between 2000-5000 mg/Kg, its means low toxicity.

All animals survived until their euthanasia at 15th day, also without presence of toxicity signals such as changing of behavior, as well as food intake and modifications in body weight gain in both genders (Table 2). The biochemical markers were not modified in both genders of mice. The values of ALT, AST, CRE, CHOL, GLU, and BUN, as well the hematological parameters have not presented significant difference between the group treated with the crude extract and the control group (data not shown).

Table 2 – Effects of the acute administration of *Randia ferox* crude extract on food intake and body weight gain of male and female *Wistar* rats.

Gender		Control	2000 mg/Kg
Male	Body weight	286.62 ± 28.89	278.07 ± 47.22
	Food intake	286.16 ± 98.55	308.16 ± 110.88
Female	Body weight	187.57 ± 35.28	189.95 ± 11.24
	Food intake	201.25 ± 95.42	210.00 ± 110.95

Data are expressed as mean ± SD. One way ANOVA followed by Tukey test when appropriate.

3.3 Sub-acute toxicity study

The treatment with *Randia ferox* crude extract in the three concentrations (100-400 mg/Kg) did not show differences on food intake and body weight gain in both genders. As can be observed in Figure 2 and 3, there was a significant difference between the group control and another two groups of treatment in the lipoperoxidation (TBARS) and reactive oxygen species in the liver of both genders.

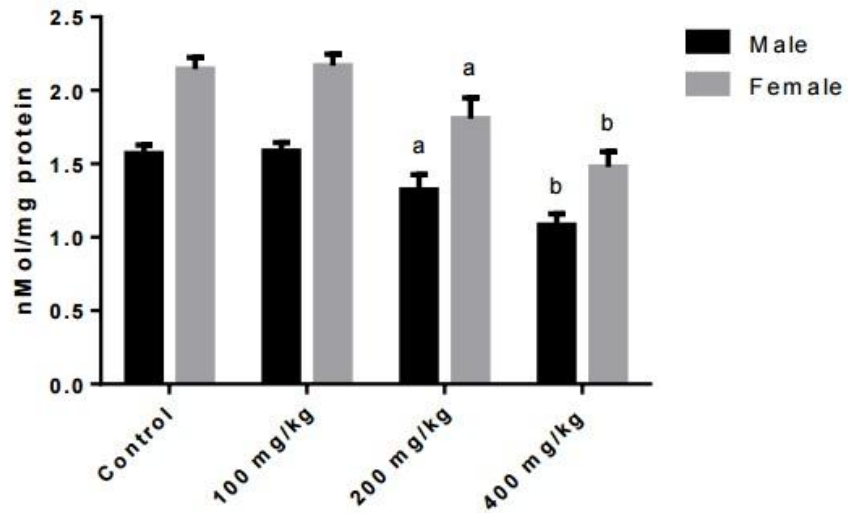


Figure 2 – Lipoperoxidation in liver of *Wistars* rats after 28 day of treatment with *Randia ferx* crude extract. Difference between the groups are considerate significant when $p < 0.05$ ($n=5$). (a) no different of control, (b) different of control, (c) different of all groups.

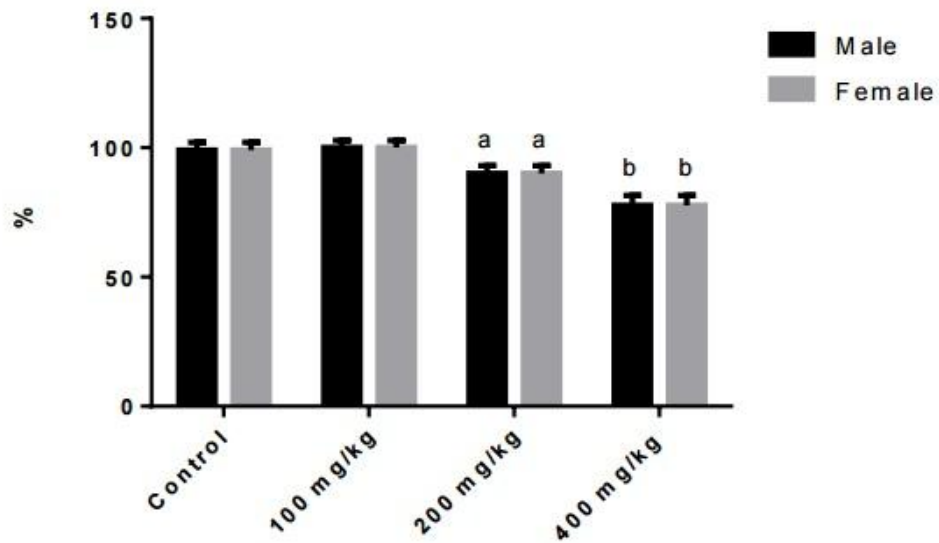


Figure 3 – Reactive oxygen species in the liver of *Wistars* rats after 28 days of treatment with *Randia ferx* crude extract. Difference between the groups are considerate significant when $p < 0.05$ ($n=5$). (a) no different of control, (b) different of control, (c) different of all groups.

In Figure 4, it can be observed that the group treated with 400 mg/Kg presented a damage in DNA comet assay, toxicity observed in the livers of both genders.

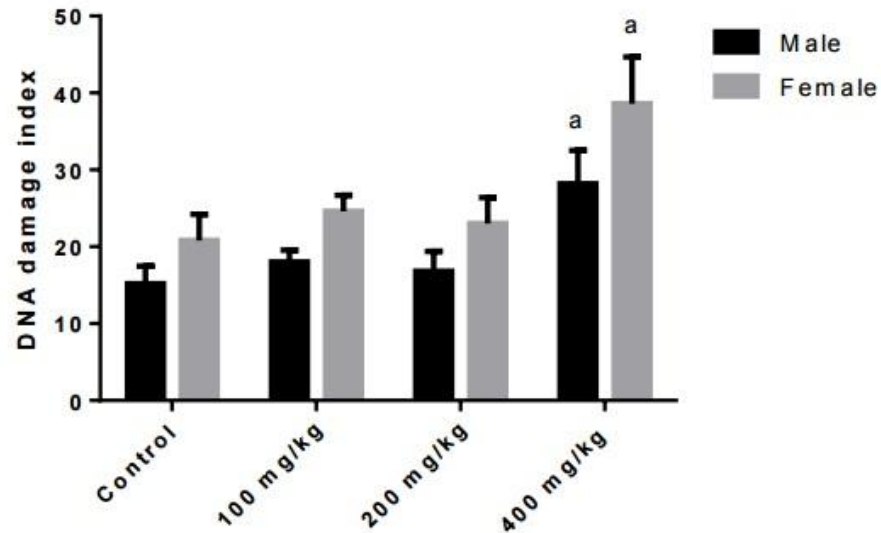


Figure 4 – DNA comet assay damage presents after 28 days of treatment with *Randia ferox* crud extract in both genders. Difference between the groups are considerate significant when $p < 0.05$ ($n=5$). (a) no different of control, (b) different of control

In Table 3 and 4, it is possible to observe that the navels of TBARS in the livers of both genders in the concentration 200 mg/Kg group (male: 1.323 and female: 1.807 nMol/mg protein) are already smaller than in the control group, being the smallest of all in the 400 mg/Kg (male: 1.082 and female: 1.477 Mol/mg protein). The ROS showed a decrease in the concentration 200 mg/Kg (90.08 % in both genders), if compared to the control group. On the 400 mg/Kg (77.66 % in both genders), such decrease was larger than in other groups. In the analysis of DNA damage, only the DNA comet assay presented a damage in the livers (male: 28.20 and female: 38.60%) for the group treated with 400 mg/Kg of RfCe. The PC showed a decrease in the liver of both genders in the 200 (male: 124.80 and female: 190.20 nMol of protein carbonyl/mg of protein) and 400 mg/Kg (male: 117.30 and female: 178.70 nMol of protein carbonyl/mg of protein). The kidneys' parameters did not present significant difference among the groups, at lass in the female kidney's that is possible to observe increase of ROS at the tree groups.

Table 3 – Effects of sub-acute treatment with *Randia ferox* on the liver and kidney parameters on male rats.

Male	Control	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Prooxidant parameters	Liver			
TBARS (nMol/ mg protein)	1.57 ± 0.05	1.587 ± 0.05	1.323 ± 0.10 ^a	1.082 ± 0.07 ^b
ROS (%)	99.05 ± 3.01	100.10 ± 2.68	90.08 ± 3.03 ^a	77.66 ± 3.95 ^b
PC (nMol PC/mg protein)	146.70 ± 8.55	145.9 ± 7.12	124.8 ± 5.83 ^a	117.3 ± 8.63 ^a
Antioxidant				
SOD (USOD/mg protein)	80.58 ± 4.83	77.09 ± 3.47	65.35 ± 21.07	74.16 ± 4.65
CAT (UCAT/mg protein)	211.90 ± 5.69	207.40 ± 9.73	209.80 ± 10.91	209.60 ± 11.15
Genotoxicity				
CA (DNA damage index)	15.20 ± 2.28	18.00 ± 1.58	16.80 ± 2.58	28.20 ± 4.32 ^a
MN (%)	1.60 ± 0.89	1.80 ± 0.83	1.80 ± 0.44	1,60 ± 0.89
Prooxidant parameters	Kidney			
TBARS (nMol/ mg protein)	1.48 ± 0.06	1.48 ± 0.07	1.47 ± 0.04	1.46 ± 0.05
ROS (%)	99.05 ± 3.01	101.30 ± 1.89	103.00 ± 2.82	102.30 ± 3.47
PC (nMol PC/mg protein)	192.90 ± 6.00	198.7 ± 6.25	199.40 ± 5.12	200.8 ± 4.04
Antioxidant				
SOD (USOD/mg protein)	74.33 ± 5.70	73.45 ± 9.56	75.95 ± 7.97	78.61 ± 4.32
CAT (UCAT/mg protein)	279.70 ± 5.95	277.70 ± 5.51	276.10 ± 7.06	273.10 ± 8.33
Genotoxicity				
CA (DNA damage index)	17.00 ± 1.58	17.60 ± 2.40	16.40 ± 1.14	16.80 ± 1.64
MN (%)	1.40 ± 0.54	1.40 ± 0.54	1.40 ± 0.54	1.60 ± 0.54

Data are express as means ± S.D. One-way ANOVA followed by Tukey test (n=5). Liver and kidney parameters lipid peroxidation (TBARS), Reactive oxygen species (ROS), DNA comet assay (CA), protein carbonyl (PC), catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD) and micronucleus (MN). Difference between the groups are considerate significant when $p < 0.05$. (a) different from control, (b) different from all groups.

Table 4 – Effects of sub-acute treatment with *Randia ferox* on the liver and kidney parameters on female rats.

Female	Control	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Prooxidant parameters	Liver			
TBARS (nMol/ mg protein)	2.14 ± 0.07	2.16 ± 0.07	1.80 ± 0.14 ^a	1.47 ± 0.10 ^b
ROS (%)	99.05 ± 3.01	100.10 ± 2.68	90.08 ± 3.03 ^a	77.66 ± 3.95 ^a
PC (nMol PC/mg protein)	223.60 ± 13.04	222.30 ± 10.86	190.20 ± 8.89 ^a	178.70 ± 13.15 ^a
Antioxidant				
SOD (USOD/mg protein)	70.61 ± 4.23	67.55 ± 3.04	57.26 ± 18.46	64.98 ± 4.08
CAT (UCAT/mg protein)	263.60 ± 7.08	258.00 ± 12.10	261.00 ± 13.57	260.70 ± 13.87
Genotoxicity				
CA (DNA damage index)	20.80 ± 3.42	24.60 ± 2.07	23.00 ± 3.39	38.60 ± 6.10 ^a
MN (%)	1.60 ± 0.89	1.80 ± 0.83	1.80 ± 0.44	1.60 ± 0.89
Prooxidant parameters	Kidney			
TBARS (nMol/ mg protein)	1.26 ± 0.05	1.26 ± 0.06	1.26 ± 0.04	1.25 ± 0.04
ROS (%)	99.05 ± 3.01	122.80 ± 2.29 ^a	124.80 ± 3.42 ^a	124.00 ± 4.21 ^a
PC (nMol PC/mg protein)	207.00 ± 6.44	213.20 ± 6.71	213.90 ± 5.49	215.40 ± 4.33
Antioxidant				
SOD (USOD/mg protein)	85.12 ± 6.53	84.11 ± 10.96	86.98 ± 9.13	90.02 ± 4.94
CAT (UCAT/mg protein)	286.10 ± 6.08	284.00 ± 5.63	282.40 ± 7.22	279.40 ± 8.52
Genotoxicity				
CA (DNA damage index)	19.40 ± 2.07	20.00 ± 2.91	18.60 ± 1.51	19.20 ± 2.16
MN (%)	1.40 ± 0.54	1.40 ± 0.54	1.40 ± 0.54	1.60 ± 0.54

Data are express as means ± S.D. One-way ANOVA followed by Tukey test (n=5). Liver and kidney parameters lipid peroxidation (TBARS), Reactive oxygen species (ROS), DNA comet assay (CA), protein carbonyl (PC), catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD) and micronucleus (MN). Difference between the groups are considerate significant when $p < 0.05$. (a) different from control, (b) different from all groups.

Our results showed that the rats present some alterations in the biochemical parameters (Table 5). The serum CHO in males reduced in the groups treated with

200 and 400 mg/Kg of extract and in female increased in the 400 mg/Kg group. The GLU levels has increased in female rats in treatment groups of 200 and 400 m/Kg if compared to the control group. The URE levels in females treated with 400 mg/Kg of extract were smaller than those in the control group. Other biochemical measurements did not present alterations in both genders.

Table 5 - Effects of sub-acute treatment with *Randia ferox* on biochemical parameters in male and female rats.

Sex	Biochemical parameters	Study Group			
		Control	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Male	ALT (U/L)	50.20 ± 7.25	48.20 ± 9.95	51.50 ± 9.11	49.40 ± 8.32
	AST (U/L)	118.00 ± 11.40	107.50 ± 15.92	107.80 ± 15.33	100.80 ± 18.25
	CHO (mg/dL)	98.25 ± 14.72	78.20 ± 8.92	63.25 ± 17.53 ^a	53.75 ± 12.84 ^a
	GLU (mg/dL)	300.20 ± 60.21	289.80 ± 64.30	281.00 ± 45.78	260.60 ± 70.15
	BUN (mg/dL)	42.40 ± 5.59	44.25 ± 2.06	38.00 ± 9.82	47.60 ± 6.06
	CRE (mg/dL)	0.86 ± 0.15	0.75 ± 0.10	0.75 ± 0.06	0.66 ± 0.09
Female	ALAT (U/L)	45.80 ± 5.76	44.40 ± 5.36	39.60 ± 6.84	47.20 ± 8.28
	ASAT (U/L)	99.40 ± 11.50	120.40 ± 13.46	117.60 ± 18.11	99.40 ± 7.66
	CHO (mg/dL)	79.40 ± 11.21	81.80 ± 16.02	97.00 ± 15.93	143.00 ± 33.17 ^a
	GLU (mg/dL)	211.40 ± 36.59	223.20 ± 36.49	289.35 ± 35.01 ^a	303.20 ± 38.27 ^a
	BUN (mg/dL)	51.00 ± 8.91	63.00 ± 6.37	52.25 ± 5.67	44.50 ± 5.00 ^a
	CRE (mg/dL)	0.79 ± 0.03	0.77 ± 0.06	0.93 ± 0.06	0.83 ± 0.06

Data are expressed as mean ± S.D. One-way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (CHO), blood sugar levels (GLU), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE). Difference between groups are considerate to be significant when $p < 0.05$. (a) Different from the control.

According to the hematological finds, in sub-acute treatment with *Randia ferox*, of blood red cells male and female rats (Table 6), there was no modification in parameters among the groups. For the average values of white series (Table 5), there was no significant difference for any of the groups in both genders.

Table 6 – Effects of sub-acute treatment with *Randia ferox* on hematological parameters in male and female rats.

Sex	Hematological parameters	Study group			
		Control	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Male	RBC (x10 ⁶ /uL)	8.63 ± 0.62	8.24 ± 0.21	8.39 ± 0.68	0.23 ± 0.50
	HGB (g/dL)	16.30 ± 0.45	15.70 ± 0.66	15.96 ± 0.75	15.70 ± 0.84
	HCT (%)	49.78 ± 3.46	48.07 ± 2.09	47.87 ± 3.76	46.40 ± 3.15
	MCV (fL)	57.76 ± 1.45	58.37 ± 1.04	57.10 ± 1.42	56.42 ± 1.01
	MCHC (g/dL)	32.74 ± 0.15	32.6 ± 0.08	33.47 ± 0.55	33.82 ± 0.99
	RDW (%)	16.18 ± 0.30	15.61 ± 0.41	15.67 ± 0.25	15.60 ± 0.46
	PLT (x10 ³ /uL)	1023.80 ± 140.74	1011.75 ± 138.36	1050.25 ± 243.24	961.75 ± 285.32
	WBC (x10 ³ /uL)	10.72 ± 1.73	9.42 ± 1.41	13.62 ± 2.42	9.57 ± 2.46
Female	RBC (x10 ⁶ /uL)	8.11 ± 0.37	7.88 ± 0.90	7.75 ± 0.36	7.90 ± 0.56
	HGB (g/dL)	15.52 ± 0.52	14.90 ± 0.78	15.10 ± 0.58	15.06 ± 0.85
	HCT (%)	45.20 ± 1.43	43.54 ± 4.62	43.57 ± 1.95	44.10 ± 3.08
	MCV (fL)	55.84 ± 1.01	55.22 ± 1.40	56.25 ± 1.17	55.90 ± 1.38
	MCHC (g/dL)	34.28 ± 0.53	34.00 ± 0.42	34.62 ± 0.65	34.13 ± 0.56
	RDW (%)	15.00 ± 0.63	15.72 ± 0.15	14.87 ± 0.56	14.93 ± 0.49
	PLT (x10 ³ /uL)	1127.62 ± 72.48	2440.33 ± 13.56	1098.00 ± 126.48	1159.66 ± 142.20
	WBC (x10 ³ /uL)	9.40 ± 0.98	10.43 ± 2.30	9.61 ± 0.99	9.33 ± 0.90

Data are expressed as mean ± S.D. One-way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate. Erythrocytes (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cells distribution width (RDW), protein (PRO), platelets (PLT) and leukocytes (WBC). Difference between groups are considerate to be significant when $p < 0.05$.

4 Discussion

The use of plants in human's health care is an ancient costume. Usually, people in general believe that the natural origin of plants means no risks. Some of them, however, present significant toxicity effects, mostly as a consequence of the presence of secondary metabolites on their composition. Besides such metabolites, several

other factors must be investigated to properly evaluate the toxicity of a plant, such as quantity and concentration of consumers, individual body metabolism and a part of the plant (Mounanga, et. al., 2015).

If not adequate, instead of healing, medicinal plants treatment may actually create other health problems. It may occur mainly because of the fact that such plants have not been investigated to confirm their potential pharmacology and toxicology (Florence, et. al., 2015), perhaps preventing their right dosages.

The low knowledge about the possible toxicology of some medicinal plants, modified an investigation over the acute and sub-acute RfCE oral toxicity in rats. Observing the HPLC analysis of RfCE, it is possible to observe six main phenolic compounds: quercetin (6.85 mg/g), chlorogenic acid (6.38 mg/g), rutin (5.52 mg/g), quercitrin (2.71 mg/g) luteolin (1.93 mg/g) and gallic acid (0.74 mg/g) . This phenolic compounds finding in RfCE is not describes in any other literature.

In acute toxicity studies, there was no mortality nor differences on body characteristics, as well no change of behavior during the 14 days of observation. As can observed in Table 2, there was no change in food intake and body weight gain. According to OECD 423 guideline, the oral toxicity of this crude extract can be classified in category 5, with a median lethal dose calculate between 2000-5000 mg/Kg (OECD, 2001).

The RfCE oral administration, in both genders, did not present differences in biochemical parameters. The blood levels of GLU, CHOL and URE, as well the activity of the enzymes AST and ALT of the treated group unchanged from the control group. This showed an absence of acute toxicity in some organs, mainly in livers and kidneys. Besides, biochemical parameters and hematological levels were not altered between the two groups in both genders. This low toxicity in red and white cells in acute oral administration may mean that there was some interaction of the phenolic compounds with the blood cells.

The disequilibrium between the generation of ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^\cdot) and superoxide anion (O_2^\cdot), with the organism defenses can potentially generate an oxidative stress. When antioxidant defenses are not successful to contain the production of ROS, the presence of oxidative stress may be related to hepatotoxicity. This overproduction of ROS can be associated with a damage in DNA, proteins and lipoperoxidation (Teppner et. al., 2015; Rafieian-Kopaei, 2013).

As it is possible to be observed in Figure 2 and 3, the lipoperoxidation (LPO) and the formation of ROS, in livers of the both genders presented a reduction if compared with the reference control group. As the formation of TBARS is related to the lipid peroxidation and is caused by the concentration of ROS, it is plausible to connect the decrease of TBARS to the respective decrease of ROS in different extract concentrations (Ali, et. al., 2016). The decrease of TBARS and ROS is proportional to the *Randia ferox* crude extract concentration. This antioxidant potential of the leaves is probably related to the presence of the knowledge capacity antioxidant of the phenolic compounds (quercetin, chlorogenic acid and rutin) (Wang, et. al., 2016; Wu, et. al., 2015).

Despite of the decrease on the livers of the females' treated with the extract, an increase of ROS occurred in the kidneys, as we can be observed in Table 4. According to Rafieian-Kopaei (2013), the increase of ROS in kidneys may cause damages on them, because the endogenous antioxidant defenses may not be enough to avoid an oxidative stress and lipid peroxidation. Although that, as can be seen in Table 4, there was not modifications in endogenous antioxidant defenses and TBARS, showing that there was not lipid peroxidation. Therefore, the obtained results indicate that the formation of ROS in kidneys is not a cause for several damage.

Some substances can induce a DNA damage when interact with the cells. The DNA CA and the MN test are broadly employed to measure the DNA damage induced to xenobiotic compounds that may cause oxidative stress (Claudio, et. al., 2016). It is possible to observe in Figure 4 an increase of CA in livers of the group treated with the high dose (400 mg/Kg) of RfCE. According to Jacociunas et. al. (2013), the chlorogenic acid in high concentrations may be a pro-oxidant agent that can facilitate the formation of free radicals. Those radicals can induce a DNA damage. Another factor may be a, oxidation of catechol. Present in flavonoids structures such a quercetin, this oxidation product may alkylate the DNA. Therefore, the high concentration of RfCE, consequently a high concentration of chlorogenic acid and quercetin, may have induced a DNA damage.

One product of oxidative stress is carbonyl protein. If as a process of oxidation in cells, the protein presents it is also oxidized, this oxidation occurred with an introduction of a carbonyl groups (C=O) in protein molecule. In this way, a high quantity of carbonyl protein can be considered a marker of the consequence of protein cells oxidative products, being usually useful to indicate a protein damage (Stocker, et. al.,

2015). In Table 3 and 4, it can be seen that both genders treated with 200 and 400 mg/Kg of RfCE showed a decrease of PC formation in the livers. As mentioned before, these groups had a decrease of ROS and TBARS that in fact may imply a reduction of oxidize cells protein.

Cholesterol is a sterol essential for many membrane cells, being a precursor of steroid hormone and bile acids. CHO is produced in the liver and can also be ingested with derivate animal food. Plants, on the other hand, are not a source of this sterol (Albuquerque, et. al., 2015). According to Wang, L. et. al. (2015), a liver damage imply decrease of CHO blood levels. As it is possible to observe in Table 5, the groups of 200 and 400 mg/Kg of males treated with RfCE presented a decrease of CHO levels (63.75 and 53.75 mg/dL, respectively). However, Lima et. al. (2014) describes that a reference value for CHO levels in healthy rats blood ranges between 45 and 76 mg/dL. Therefore, besides the significant difference between this groups and the control, those levels are not considered a liver damage index. In female group, the increase of CHO levels in the group treated with 400 mg/Kg of RfCE may be justified with the increase of the GLU at the same group. According with Olatunji et al. (2012), the insulin resistance or glucose intolerance can cause an increase of LDL cholesterol blood levels.

No significant changes in body weight gain and food intake were observed in all groups of both genders. With exception of CHO, all other analyzed biochemical parameters did not present significant differences from the control group in males. However, in females groups treated with 200 and 400 mg/Kg of RfCE, an increase of GLU blood levels occurred. Thereby Weigt, et. al. (2015) states that estradiol hormone can modulate a glucose homeostasis and the GLU blood levels only change significantly in the female gender, a hormonal variation is probably what have induced the hyperglycemia. Some kidneys' damage conditions have as a consequence an increase of urea and creatinine blood levels (Zhybak, et. al., 2016). In Table 5, it can be seen, in the 400 mg/Kg female group, a decrease in BUN levels (44.50 mg/dL). Although, according to Lima et. al. (2014), this level of BUN is within the track of healthy BUN levels (24-49 mg/dL) in female rats.

Although the quercetin and rutin present an anti-thrombotic capacity (Dajas, et. al., 2015; Dar, et. al., 2012), the hematological parameters (Table 6) of sub-acute toxicity showed no significant difference between the groups treated and the control in

rats. Therefore, these results imply that the concentration of RfCE metabolites is not enough to interactive and change the red and white blood cells measure.

5 Conclusion

This present study concluded that the RfCE of *Randia ferox* did not evidence toxicity after administration of 2000 mg/Kg in male and female rats *Wistars*. Therefore, this acute dose is considered safe and classified as category 5, according to OECD 432. After 28 days of treatment with different doses, it was observed a biochemical change in ROS, TBARS and PC in livers at the 200 and 400 mg/Kg groups, which represent a potential antioxidant capacity of RfCE. However, the damage in DNA CA in livers at 400 mg/Kg demonstrated that the RfCE in higher doses may cause toxic effects. When it was compered both gender, is possible observe that female gender has some parameters changed, this may be caused by hormonal variations. Nevertheless, more investigations about safety of the RfCE are required.

Acknowledgments

The author acknowledge the financial support of FAPERGS and CNPq/Brazil. The author received donation of the commercials kits of the company Bioclin/Quibasa.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro* L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego. 105, 121–126.
- Albuquerque, T. G.; Oliveira, M. B. P. P.; Sanches-Silva, A.; Costa, H. S., 2016. Cholesterol determination in foods: Comparision between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. Food Chemistry. 193, 18-25.

- Alerico, G. C.; Beckenkamp, A.; Vignoli-Silva, M.; Buffon, A.; L. von Poser, G., 2015. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul, state of Brasil. 176, 305-310.
- Ali, I.; Liu, B.; Farooq, M. A.; Islam, F.; Azizullah, A.; Yu, C.; Su, W.; Gan, Y., 2016. Toxicological effects of bisphenol A on growth and antioxidante defense system in *Oriza sativa* as revealed by ultrasctructure analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 124, 277-284.
- Berton, T.R.; Conti, C.J.; Mitchell, D. L.; Aldaz, C. M; Lubet, R.A.; Fischer S. M. 1998. The effect of vitamin E acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis *Mol. Carcinogen.*, 23, pp. 175–184 186 (1990), pp. 464–478.
- Bitu, V. C. N.; Bitu, V. C. N.; Matias, E. F. F.; Lima, W. P.; Portelo, A. C.; Coutinho, H. D. M.; Menezes, I. R. A. M., 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 172, 265-272.
- Carvalho, A. C. B.; Ramalho, L. S.; Marques, R. F. O.; Perfeito, J. P. S., 2014. Regulation of herbal medicines in Brazil. *Journal of Etnopharmacology*. 158, 503-506.
- Claudio, S. R.; Gollucke, A. P. B.; Yamamura, H.; Morais, D. R.; Bataglioni, G. A.; Eberlin, M. N.; Peres, R. C.; Oshima, C. T. F.; Ribeiro, D. A., 2016. Purple carrot extract protects against cádmium intoxication in multiple organs of rats: Genotoxicity, oxidative stress and tissue morphology analyses. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.*, 33, 37-47.
- Collins, A. R., 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research*. 681, 24-32.
- Colpo, E., Vilanova, C.D.D.A., Reetz, L.G.B., Duarte, M.M.M.F., Farias, I.L.G., Meinerz, D.F., Mariano, D.O.C., Vendrusculo, R.G., Boligon, A.A., Corte, C.L.D., Wagner, R., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T., 2014. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition* 30, 459-465.
- Dajas, F.; Abin-Carriquiry, J. A.; Arredondo, F.; Blasina, F.; Echeverry, C.; Martínez, M.; Rivera, F.; Vaamonde, L., 2015. Quercetin in brain deseases: Potential and limits. *Neurochemistry International*. 89, 140-148.

- Dang, L.; Van Damme, E. J. M., 2015. Toxic protein in plants. *Phytochemistry*. 117, 51-64.
- Dar, M. A.; Tabassum, N., 2012. Rutin- potent natural thrombolytic agent. *International Current Pharmaceutical Journal*. 1, 531-535.
- Florence, N. T.; Clarice, D. N.; Hubert, D. J.; Raceline, G. K.; Adolphe, M.; Pierre, K.; Theophile, D., 2015. Acute and sub-acute toxicity of a lyophilised aqueous extract of the aerial part of *Spilanthes africana* Deline in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 172, 145-154.
- Hübsch, Z.; Van Zyl, R. L.; Cock, I. E.; Van Vuuren, S. F., 2014. Interactive antimicrobial and toxicity profiles of conventional antimicrobials with Southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 93, 185-197.
- Jacociunas, L. V.; Andrade, H. H. R.; Lehmann, R.; Abreu, B. R. R.; Ferraz, A. B. F.; Silva, J.; Grivicich, I.; Dihl, R. R., 2013. Artichoke induces genotoxicity in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) cytome assay. *Food and Chemical Toxicology*. 55, 56-59.
- LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C., 1992. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* 05, 227-231.
- Leonhardt, C.; Calil, A. C.; Souza, L. S.; Silva, V. S., 2008. Comportamento germinativo de sementes de limoeiro-do-mato *Randia ferox* (Cham. & Schlecht) DC. (Rubiaceae) armazenadas em câmara seca. *Pesq. Agrop. Gaúcha*. Porto Alegre. 14, 161-167.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R., 1990. Determination of carbonyl contents in oxidatively modified proteins *Methods Enzymol.*, 186, 464-478.
- Lima, C. M.; Lima, A. K.; Melo, M. G. D.; Dória, G. A. A.; Leite, B. L. S.; Serafini, M. R.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Araújo, A. A. S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 10, 01-09.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

- McCord, J. M. 1994. Mutant mice, Cu, Zn superoxide dismutase, and motor neuron degeneration. *Science*. 266, 1586–1587.
- Mounanga, M. B.; Mewono, L.; Angone, S. A., 2015. Toxicity studie of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. 174, 618-627.
- Myrhe, O.; Andersen, J. M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*. 65, 1575-1582.
- Olatunji, L. A.; Michael, O. S.; Adewumi, F. O.; Aiyebayin, I. J.; Olatunji, V. A. 2012. Combined estrogen-progesterogen but not progesterogen only oral contraceptive alters glucose tolerance and plasma lipid profile in female rats. *Pathophysiology*. 19, 29-34.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1995. Guideline 407. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. July 1995. 468 Adopted by the Council on 27th.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. December 2001. 470 Adopted by the Council on 17th.
- Parra, A. L.; Yhebra, R. S.; Sardiñas, I. G.; Buela, L. I., 2001. Comparative study of the assay of *Arthemisa salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extract. 8, 395-400.
- Parthiban, R.; Vijayakumar, S.; Prabhu, S.; Yabesh, J. G. E. M., 2015. Quantitative traditional knowledge of medicinal plants used to treat livestock diseases from Kudavasal taluk of Thiruvarur district, Tamil Nadu, India. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.016>>
- R Core Team., 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rafieian-Kopaei, M., 2013. Medicinal plants for renal injury prevention. *Journal of Renal Injury Prevention*. 2, 63-65.

- Saraiva, M. E.; Ulisses, A. V. R. A.; Ribeiro, D. A.; Oliveira, L. G. S.; Macêdo, D. G.; Sousa, F. F. S.; Menezes, I. R. A.; Sampaio, E. V. S. B.; Souza, M. M. A., 2015. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the State of Pernambuco, Northeast Brazil. 171, 141-153.
- Silva, A.R.H.; Moreira, L.R.; Brum, E.S.; Freitas, M.L.; Boligon, AA.; Margareth, L.A.; Roman, S.S.; Mazzanti, C.M.; Brandão, R., 2014. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 153, 908-916.
- Stocker, P.; Ricquebourg, E.; Vidal, N.; Villard, C.; Laffite, D.; Sellami, L.; Pietri, S., 2015. Fluorimetric screening assay for protein carbonyl evaluation in biological samples. *Analytical Biochemistry*. 482, 55-61.
- Teppner, M.; Böss, F.; Ernst, B.; Pähler, A., 2015. Application of lipid peroxidation products as biomarkers for flutamide-induced oxidative stress *in vitro*. *Toxicology Letters*. 238, 53-59.
- Thomas, P.; Harvey, S.; Gruner, T.; Fenech, M., 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 638, 37-47
- Wang, G.; Kang, S.; Yin, Z.; Jia, R-Y.; Lai, X.; Zhou, X.; Liang, X.-X.; Li, L.-X.; Zou, Y.-F.; Lv, C.; He, C-L.; Ye, G.; Yin, L-Z.; Jing, B., 2015. Therapeutic effect of Chinese patent medicine "Wuhuanghu" on porcine infections pleuropneumonia and its acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 40, 388-396.
- Wang, L.; Chen, C.; Su, A. Zhang, Y.; Yuan, J.; Ju, X. 2016. Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction of defatted adlay (*Coix lachrymal-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed meal. *Food Chemistry*. 196, 509-517.
- Weigh, C.; Hertrampf, T.; Flenker, U.; Hülsemann, F.; Kurnaz, P.; Fritzermeier, K. H.; Diel, P., 2015. Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonist and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. 154, 12-22.

Wu, D.; Bao, C.; Li, L.; Fu, M.; Wang, D.; Xie, J.; Gong, X., 2015. Chlorogenic acid protects against cholestatic liver injury in rats. *Journal of Pharmacological Science*. 1-6.

Zhybak, M.; Beni, V.; Vagin, M. Y.; Dempsey, E.; Turner, A. P. F.; Korpan, Y., 2016. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite. *Biosensors and Bioelectronics*. 77, 505-511.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a OMS, a maioria dos países subdesenvolvidos recorre a terapias de origens naturais, sendo que 85% destes utiliza plantas medicinais como terapia. Uma crença que ainda existe nos dias atuais é que produtos de origem natural não possuem toxicidade (MACHADO, et. al., 2014, p. 528). Porém, alguns estudos já relataram a presença de compostos em plantas capazes de interagir com medicamentos, alimentos e de também causarem danos à saúde (BALBINO, DIAS, 2010, p. 992). A espécie *Randia ferox* Cham & Schlecht) DC. é popularmente conhecida como “limoeiro-do mato” e é distribuída da região Centro até o Sul do Brasil, na cultura popular as suas folhas são usadas como cicatrizantes (LEONHARDT, et. al., 2008, p. 161; NOELLI 1998, p. 192). Baseado no fato de a maioria das plantas medicinais não possuem estudos sobre a seus compostos e segurança, motivou-se a fazer um estudo para quantificar seus metabólitos secundários através da CLAE, avaliar a toxicidade aguda e sub-aguda do extrato bruto das folhas desta espécie, assim como também uma avaliar a sua genotoxicidade no fígado e no rim.

Na quantificação do extrato bruto das folhas de *Randia ferox*, foi quantificado seis polifenóis, são eles: quercetin (6,85 mg/g), ácido clorogênico (6,38 mg/g), rutina (5,52 mg/g), quercitrina (2,71 mg/g), luteolina (1,71 mg/g) e ácido gálico (0,71 mg/g). A quantificação e presença desses polifenóis nas folhas da espécie *Randia ferox*, até então, não haviam sido relatados na literatura.

A toxicidade aguda do extrato bruto (EB) das folhas da espécie seguiu as diretrizes estipuladas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 423 (2001), com algumas modificações. Segundo a OECD 423, na toxicidade aguda é possível analisar quais serão os efeitos tóxicos em um período curto de tempo (14 dias), para a exposição através da administração de um xenobiótico. Os grupos testes (3 machos e 3 fêmeas) foram tratados com uma única dose de 2000 mg/Kg de EB e os grupos controles com água destilada. Durante o período do experimento, não foi observado nenhuma morte e também nenhuma alteração do peso corporal e ingestão de alimento. Na avaliação bioquímica e hematológica do sangue, não observou-se diferença significativa entre os grupos tratados e os controles, concluindo que uma dose única do EB não é capaz de causar

toxicidade. Através desses dados, o EB da planta foi classificado, segundo a OECD 423, como categoria 5. Ou seja, estima-se que a sua dose letal está entre as concentrações de 2000 e 5000 mg/Kg de EB.

Para a avaliação da toxicidade sub-aguda do EB, foi utilizado o Guia da OECD 407 (1995), com algumas modificações. Ao todo, foram 40 ratos *Wistar* (20 machos e 20 fêmeas) que foram divididos em quatro grupos cada sexo: o grupo controle tratado com água e os grupos que receberam o EB oralmente nas seguintes concentrações 100, 200 e 400 mg/Kg de peso corporal. Os animais foram tratados durante o período de 28 dias com uma única dose diária de água ou EB nas suas diferentes concentrações. Durante o experimento não foi observado nenhuma morte, diferença na ingestão de comida ou ganho de peso corporal.

Em relação a lipoperoxidação (LPO), as espécies reativas de oxigênio (ROS) e a formação de proteína carbonil (PC), foi possível observar uma diminuição nos níveis hepáticos dos grupos tratados com o extrato nas concentrações 200 e 400 mg/Kg. Segundo Zheng et al. (2015, p. 93, 96), o ácido clorogênico possui uma potente atividade antioxidante e também uma capacidade hepatoprotetora. Outro metabólito presente no EB da espécie e que também possui uma atividade antioxidante é a quercetina (BAGDAS, e al., 2015, p. 59). Portanto, através dos resultados pode-se sugerir uma capacidade antioxidante do EB no fígado. No rim das fêmeas houve um aumento de ROS em todos os grupos tratados com o EB, porém como não houve alterações em outros testes como a LPO, PC e parâmetros bioquímicos marcadores de danos renais, não foi considerado uma toxicidade renal.

Na avaliação da genotoxicidade no fígado e no rim, não houve alterações renais nos parâmetros analisados. Porém, nos animais tratados com a dose de 400 mg/Kg de EB, foi observado um aumento do DNA cometa, sugerindo uma genotoxicidade nessa dose. De acordo com Bagdas et. al. (2015, p. 59), o ácido clorogênico em elevadas concentrações pode ter uma atividade pró-oxidante, ou seja, ele pode causar oxidação e assim ser tóxico para o DNA. Outro metabólito que também possui esse efeito pró-oxidante é o flavonoide quercetina.

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados, foi possível observar que nos machos ocorreu uma diminuição do colesterol (63,75 e 53,75 mg/dL) nas concentrações de 200 e 400 mg/Kg, respectivamente. Porém, de acordo com Lima et. al. (2014, p. 4), os níveis de colesterol nesses grupos são consideráveis dentro da faixa normal de referência que corresponde a 45-76 mg/dL. Nas fêmeas os valores de

glicose se demonstraram elevados nos grupos tratados com 200 e 400 mg/Kg de EB. Entretanto, como as mesmas alterações não foram observadas nos machos desse mesmo grupo, acredita-se que essa variação glicêmica seja devido a variações sanguíneas do estradiol (WEIGT, et al.,2015, p. 19). Outras diferenças na bioquímica do sangue não foram observadas.

Os parâmetros hematológicos não demonstraram diferença significativa dos grupos tratados com o EB da espécie *Randia ferox* em relação ao controle. Esses resultados sugerem que os compostos presentes no EB das folhas não causaram toxicidade no sistema hematopoiético dos ratos.

Frente aos resultados expostos, pode-se sugerir que o estrato bruto das folhas da espécie *Randia ferox* é seguro quando tratado agudamente. Em relação ao tratamento sub-agudo, pode-se dizer que o tratamento não apresentou toxicidade nos parâmetros analisados. Entretanto, houve uma genotoxicidade no fígado do grupo tratado com a maior concentração do extrato. Contudo, maiores estudos devem ser feitos para analisar esses efeitos fisiológicos causados pela administração sub-aguda da planta.

6 CONCLUSÕES

- Na análise da CLAE do extrato bruto das folhas foi possível quantificar o ácido clorogênico, rutina, quercetrina, luteolina, ácido gálico, sendo que a quercetin foi o metabólito de maior concentração.
- Na avaliação da toxicidade aguda não foi observado mortalidade morbidade, assim como diferença no ganho de peso, ingestão de comida e na análise bioquímica e hematológica. O extrato foi classificado na categoria 5, com dose letal estimada entre 2000 e 5000 mg/Kg, segundo o Guia da OECD 423.
- Na toxicidade subaguda não foi observado mudanças no ganho de peso e na ingestão de comida. Assim como, durante os 28 dias de tratamento não ocorreram mortes.
- Na análise bioquímica do sangue, houve uma diminuição dos níveis de colesterol total nos grupos 200 e 400 mg/Kg dos machos, os níveis foram considerados dentro dos normais e uma possível hepatotoxicidade foi descartada. As fêmeas tratadas com essas mesmas concentrações obtiveram uma hiperglicemia, o que foi associada a variações hormonais.
- Nos parâmetros hematológicos não houve nenhuma alteração dos grupos tratados com relação ao grupo controle, o que sugere a falta de toxicidade no sistema hematopoiético.
- Na análise bioquímica do fígado, nos grupos tratados com 200 e 400 mg/Kg do extrato bruto, ocorreu uma diminuição na lipoperoxidação e no percentual de espécies reativas de oxigênio, assim como na formação de proteína carbonil. No qual sugere uma atividade hepática antioxidante do extrato. No rim das fêmeas foi observado um aumento de espécies reativas de oxigênio em todos os grupos tratados com o extrato bruto da planta, porém como não houve outras alterações indicativas de estresse oxidativo, não foi considerada uma atividade nefrotóxica.
- No que se refere a genotoxicidade, foi possível observar um aumento do DNA cometa no fígado dos grupos de ambos os gêneros tratados com a

planta na concentração de 400 mg/Kg. Sugerindo um efeito pró-oxidante e genotóxico de altas concentrações do metabólitos presentes nas folhas.

- Frente ao exposto, maiores estudos devem ser feitos para avaliar a toxicidade e possível genotoxicidade do extrato bruto das folhas da espécie *Randia ferox*.
- Para estudos futuros pretende-se avaliar a capacidade cicatrizante descrita no uso popular da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA FILHO, A. J. **Uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais da sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermagem.** Revista Latino Americana de Enfermagem, v. 14, n. 3, 2006.

ALVINO, L. D.; MACHADO, I. C. S.; QUIRINO, Z. G. M. **Ecologia da polinização de *Mandevilla tenuifolia* (J. C. Mikan) Woodson uma Apocynaceae exclusivamente psicófila.** Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu-MG, 2007. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1391.pdf>> Acesso em: 29/09/2015.

ANDREAZEN, K., BREMER, B. **Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data.** American Journal of Botany. v. 83, n. 11, p. 1731-1748, 2000.

ANHORLD, A. I.; HECK, T. G. **Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações.** XXII Seminário de Iniciação Científica, Salão do Cohecimento. Ijuí. 2014.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RCD nº 26, de 13 de maio de 2014.** Ministério da Saúde, Diário Oficial da União, 2014.

BAGDAS, D.; ETOZ, B. C.; GUL, Z.; ZIYANOK, S.; INAN, S.; TURACOZEN, O.; GUL, N. Y.; TOPAL, A.; CINKILIC, N.; TAS, S.; OZYIGIT, M. O.; GURUN, M. S. **In vivo systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions: Wound healing effects and cytotoxicity/genotoxicity profile.** Food and Chemical Toxicology. v. 81, p. 54-61, 2015.

BALASUDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAM, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chemistry. v. 99, p. 191-203, 2006.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. **Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Revista Brasileira de Farmacognosia. n. 20, v. 6, p. 992-1000, 2010.

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

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BREMER, B.; MANEN, J-F. **Phylogeny and classification of de subfamily Rubioideae (Rubiaceae)**. Plant Systematics and Evolution. p. 43-72, 2000. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/23644406?seq=1#page_scan_tab_contents> Acesso em: 29/09/2015.

CABRERA, A.; MACH, N. **Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón**. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética. v. 16, n. 4, p. 143-153, 2012.

CARVALHO, L. F. P. **Avaliação de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com endometriose pélvica**. Tese (Programa de Obstetrícia Ginecológica) Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2012.

CHENG, Y-B.; LO, I-W.; SHYUR, L-F.; YANG, C-C.; HSU, Y-M.; SU, J-H.; LU, M-C.; CHIOU, S-F.; LAN, C-C.; WU, Y-C.; CHANG, F-R. **New alkaloids from Formosan zoanthid *Zoanthus kuroshio***. Tetrahedron. v. 71, p. 8601-8606, 2015.

DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; ARREDONDO, F.; BLASIANA, F.; ECHEVERRY, F.; MARTÍNEZ, M.; RIVERA, F.; VAAMONDE, V. **Quercetin in brain diseases: Potential and limits**. Neurochemistry International. v. 89, p. 140-148, 2015.

DE SÁ, I. M.; ELISABETSKY, E. **Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective**. Journal of Ethnopharmacology. v. 142, p. 762-768, 2012.

DELPETRE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense. Rubiáceas**. v. I, Gêneros de A-G. p. 20- 22, 2004.

ERBANO, M. **Morfoanatomia de folha e caule das espécies *Centrolobium tomentosum* Guillemín ex Benth. (Fabaceae), *Genipa americana* L. e *Randia armata* (SW.) DC. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

FERNANDES, C. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; ALVES, R. C. **Estresse oxidativo e o mecanismo de defesa de plantas contra patógenos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Rondônia. 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev. Ass. Med. Brasil. v. 43, n. 01, p. 61-68, 1997.

GILANI, H. A.; RAHMAN, A.-R. **Trends in ethnopharmacology.** Journal of Ethnopharmacology. p. 43-49, 2005.

GOMES, C.; LOURENÇO, E. L. B.; LIUTI, E. B.; DUQUE, A. O.; NIHI, F.; LOURENÇO, A. C.; MENDES, T. C.; JUNIOR, A. G.; DALSENTER, P. R. **Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats.** Journal of Ethnopharmacology. n. 142, p. 481-487, 2012.

KAMEL, R.; MOSTAFA, D. M. **Rutin nanostructure lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential.** Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. v.153, p. 59-66, 2015.

KICEL, A.; OWCZAREK, A.; MICHEL, P.; SKALICKA-WOZNIAK, K.; KISS, A. K.; OLSZEWKA, M. A. **Application of HPLCCC, UHPLC-PDA-ESI-MS³ and HPLC-PDA methods for rapid, one-step preparative separation and quantification of rutin in *Forsythia* flowers.** Industrial Crops and Products. v. 76, p. 86-94, 2015.

LANINI, J.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NAPPO, S.; CARLINI, E. A. **“O que vem da terra não faz mal” – relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 19, n. 1^a, p. 121-129, 2009.

LEONHARDT, C.; CALIL, A. C.; DE SOUZA, L. S.; DA SILVA, V. S. **Comportamento germinativo de sementes de limoeiro-do-mato *Randia ferox* (Cham. & Schlecht) DC. (Rubiaceae) armazenadas em câmara seca.** Pesq. Agrop. Gaúcha. Porto Alegre. v. 14, n. 02, p. 161-167, 2008.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; **Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Araújo, A. A. S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.** Scientia Plena. 10, 01-09.

LIMA, J. F.; SILVA, M. P. L.; TELES, S.; SILVA, F.; MARTINS, G. N. **Avaliação de diferentes substratos na qualidade fisiológica de sementes de melão de caroá [*Sicana odorífera* (Vell.) Naudim]**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Botucatu. v. 12, n. 2, p. 163-167, 2010.

LING, S-K; LOMORITA, A.; TANAKA, T.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K; KOUNO, I. **Iridois and athraquinones from the Malasyan Medicinal Plant, *Saprosma scortechinii* (Rubiaceae)**. Chem. Pharm. Bull. v. 50, n. 8, p. 1035-1040, 2002.

MACHADO, H. L.; MOURA, V. L.; GOUVEIA, N. M.; COSTA, G. A.; ESPINDOLA, F. S.; BOTELHO, F. V. **Pesquisa e atividades de extensão em fitoterapia desenvolvidas pela Rede FitoCerrado: uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos por idosos em Uberlândia – MG**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v. 16, n. 3, p. 527-533, 2014.

MAI, L. H.; CHABOT, G. G.; GRELLIER, P.; QUENTIN, L.; DUMONTET, V.; POULAIN, C.; ESPINDOLA, L. S.; MICHEL, S.; VO, H. T. B.; DEGUIN, B; GROUGNET, R. **Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Calendonian *Gardenia* species (Rubiaceae)**. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 93, p. 93-100, 2015.

MEI, N.; GUO, L.; FU, P. P.; HEFLICH, R. H.; CHEN, T. **Mutagenicity of comfrei (*Symphytum officinale*) in rat liver**. British Journal of Cancer. v. 92, p. 873-875, 2005.

MARGALHO, L. F.; da ROCHA, A. E. S.; SECCO, R. S. **Rubiaceae *Juss.* da Restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil**. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat., Belém. v. 4, n. 3. p. 303-339, 2009.

MENEZES, et. al. **Apostila de Anatomia e Morfologia de Plantas Vasculares**. Curso de Ciências Biológicas, UFRN, 2004. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA_2AAD/morfologia-floral> Acesso em: 29/09/2015.

MESSIAS, M. C. T. B.; MENEGATTO, M. F.; PRADP, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. **Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, Mg, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas. v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MORAES, R. C.; LANA, A. J. D.; KAISER, S.; CARVALHO, A. R.; DE OLIVEIRA, L. F. S.; FUENTEFRIA, A. M.; ORTEGA, G. G.; **Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D. C. against resistant non-*albicans* *Candida* isolates.** Industrial Crops and Products. v. 69, p. 7-14, 2015.

MORENO, B. P.; FIORUCCI, L. L. R.; CARMO, M. R. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; BALDOQUI, D. C. **Terpenoids and coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae).** Biochemical Systematics and Ecology. v. 56, p. 80-82, 2014.

MOURA, V. M.; DOS SANTOS, P. D.; SANTIN, S. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. **Constituintes químicos de *Galiante brasiliensis* (Rubiaceae).** Química Nova. v. 29, n. 03, p. 452-455, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction, and analysis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NAVARRETE, N. M.; VIDAL, M. M. C.; LAHUERTA, J. J. M. N. **Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud.** Actividad Dietética. v. 12, n. 2, p. 64-68, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. Quarta Edição, 2006.

NOELLI, F. S. **Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas.** Trabalho apresentado no I Simpósio de Etnobiologia e Etnoecologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Diálogos, DHI/UEM. v. 2, p. 177-199, 1998.

OLIVEIRA, D. M. S.; LUCENA, E. M. P. **Uso de plantas medicinais por moradores de Quixadá-Ceará.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Campinas. v. 17, n.3, p. 407-412, 2015.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais. v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. **Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da**

Unidade Oncológica de Anápolis. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Campinas, v. 16, n. 1, p. 32-40, 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 1995. **Guideline 407. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents.** July 1995. 468 Adopted by the Council on 27th.

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

PAULY, G.; FLEURY, M. **Cosmetic contained plant extracts.** FR, 6460720, 06 de dezembro de 1999. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/6406720.html>> Acesso em: 16/11/2015.

PEREIRA, G. F. **A família Rubiaceae Juss na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermaceae.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, Brasil, 2007.

PEREIRA, M. S.; BARBOSA, M. R. V. **A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae.** Acta. Bot. Bras. v. 18, n. 8, p. 305-318, 2004.

PIERDONÁ, T. M.; LIMA, N. R.; RODRIGUEZ, R. C. M.; TEIXEIRA, J. P.; GONÇALVES, R. P.; FONTENELE, J. B.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; LEAL, L. K. A. M. **The *Operculina macrocarpa* (L.) urb. (jalapa) tincture modulates human blood platelet aggregation.** Journal of Ethnopharmacology. v. 151, p. 151-157, 2014.

RIBEIRO, D. A.; MACEDO, D. G.; OLIVEIRA, L. S. G.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. **Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil.** Ver. Bras. de Plantas Mediciniais. Campinas. v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. **A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico.** Review Article. Biosci. J. Uberlândia. v. 21, n. , p. 133-149, 2005.

RICARDO, L. M.; GOULART, L. M. A.; BRANDÃO, M. G. L. **Plantas medicinais da Bacia do Rio das Velhas: avaliação das condições para a produção e uso em saúde pública.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Campinas. v. 17, n. 3, p. 398-406, 2015.

ROJO-MARTINEZ, G.; et. al.; **Consumo de café y diabetes mellitus.** Endocrinol Nutric. v. 51, n. 10, p. 556-563, 2005.

ROMERO, G. B.; CASTELLA R. M. T. **Actualización en fitoterapia y plantas medicinales.** Terapéutica en APS. v. 19, n.3, p. 149-160, 2012.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: Caracterização e morfologia geral.** Editora da Universidade Federal da Bahia. p. 1-73, 2008.

SIMÕES, C. O. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRIVIK, C. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2 Ed., p. 821, 2010.

SINTOX. **Casos, óbitos e letalidade de intoxicação humana por agentes e por região.** Brasil, 2012. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sintox/media/Tabela%203_2012.pdf> Acesso em: 19/11/2015.

SOARES, K. P.; AMORIN, L. N.; NASCIMENTO, K. M.; LIMA-NETO, J. G.; MALLMANN, E. J. J.; VIEIRA, M. G. S.; RIBEIRO, S. P. L.; MELO, T. S.; SOUZA, G. C.; BARRETO, M. B.; BRASIL, N. V. G. P. S.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A. **Atividade de extratos de plantas do Nordeste do Brasil contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro expandido.** Anais do XLVI Congresso Brasileiro de Química. 2006. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2006/trabalhos2006/13/31-IC-306-468-13-T2.htm>> Acesso em: 16/11/2015.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A. & ZAPPI, D. **Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae.** Rodriguésia. v. 58, n. 03, p. 549-616, 2007.

VIEIRA, M. G. S.; MAGALHÃES, D. V.; NETO, J. S. M.; BRASIL, N. V. G. P. S. **Eestudo fitoquímico e atividade antioxidante dos extratos de plantas do Parque Botânico do Ceará.** Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC, Fortaleza, CE, 2005. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/57ra/programas/SENIOR/RESUMOS/resumo_3492.html> Acesso em: 16/11/2015.

VON WICHTMANN, M. F. **Café y enfermedades cardiovasculares.** Atención Primaria. v. 41, n. 11, p. 633-636, 2009.

YEBOAH, E. M. O.; YEBOAH, S. O.; SINGH, G. S. **Recent applications of *Cinchona* alkaloids and their derivatives as catalysts in metal-free asymmetric synthesis.** Tetrahedron. v. 67, p. 1725-1762, 2011.

WALTHER, L. A. A. S.; BARILLAS, K. S.; CUADRADO, P. G. S.; SEGOVIA, F. T.; ROJAS, M. V; NÚÑES-CORTÉZ, J. M. **Variabilidad del contenido de polifenóis de distintos tipos de vino y su potencial aplicación al conocimiento de sus efectos biológicos.** Medicina Clínica. v. 114, n. 9, p. 331-332, 2000.

WEIGH, C.; HERTRAMPF, T.; FLENKER, U.; HÜLSEMANN, F.; KURNAZ, P.; FRITZERMEIER, K. H.; DIEL, P., 2015. **Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonist and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats.** 154, 12-22.

ZHANG, P.; SHAO, L.; SHI, Z.; ZHANG, Y.; DU, J.; CHENG, K.; YU, P. **Pregnane alkaloids from *Sarcococca ruscifolia* and their cytotoxic activity.** Phytochemistry Letters. v. 14, 31-34, 2015.

ZHENG, Z.; SHENG, L.; LU, B.; JI, L. **The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorative hepatic inflammation.** Chemico-Biological Interactions. v. 238, p. 93-101, 2015.