

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

Rafaela Castro Dornelles

Richardia brasiliensis Gomes: **COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA,
ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICIDADE**

Santa Maria, RS
2022

Rafaela Castro Dornelles

Richardia brasiliensis Gomes: **COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

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

Santa Maria, RS
2022

Dornelles, Rafaela

Richardia brasiliensis Gomes: COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA,
ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICIDADE / Rafaela Dornelles.-
2022.

144 p.; 30 cm

Orientador: Liliane Bauermann

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2022

1. Poaia-branca 2. Compostos bioativos 3. Rubiaceae
4. Antioxidante 5. Antiproliferativo I. Bauermann,
Liliane II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, RAFAELA DORNELLES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

RAFAELA CASTRO DORNELLES

Richardia brasiliensis Gomes: **COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia - **Ênfase em Neuropsicofarmacologia e imunofarmacologia**

Aprovada em 22 de julho de 2022:

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

Francine Cadoná, Dr.^a (UFN) – Parecer

Gabriela Trevisan dos Santos, Dr.^a (UFSM) – Videoconferência

Ionara Irion Dalcol, Dr.^a (UFSM) – Videoconferência

Quelen Iane Garlet, Dr.^a (UcPel) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao meu amor Juliano Pias Rodrigues que me deu e me dá apoio sempre, confiança na vida e em mim e está sendo essencial na conclusão desta tese.

Aos colegas do Lafex por todo o auxílio e ajuda em cada etapa do processo, em especial a minha colega de laboratório, profissão e amiga Camille Gaube Guex, que foi extrema a todo o momento, me ajudando e auxiliando no que fosse preciso. Não tenho como agradecer essa ajuda preciosa.

A minha orientadora Liliane de Freitas Bauermann pela pessoa querida que és e pela orientação e paciência durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

A minha coorientadora Melânia Palermo Manfron por todos os ensinamentos e incentivos durante o período que trabalhamos juntas na UFSM.

As professoras Daniele Rubert Nogueira Librelotto (UFSM), Micheli Mainard Pillat (UFSM), Alencar Kolinski Machado (UFN) e Michel Mansur Machado (UNIPAMPA) pela ajuda nas várias etapas experimentais da pesquisa bem como o auxílio durante a redação desta tese.

A Universidade Federal de Santa Maria pela cessão de todo o material necessário ao desenvolvimento do trabalho e infraestrutura disponível.

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

E a todos os demais que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse concluído.

O meu muito obrigada!

Ciência pode não ter pátria, mas os cientistas têm,
e os países que mantêm um grande número de cientistas
beneficiam-se do avanço do conhecimento.

Retirado do livro "Radicais Livres bons, maus e naturais"

RESUMO

Richardia brasiliensis Gomes: COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICIDADE

AUTORA: Rafaela Castro Dornelles

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

Plantas medicinais são utilizadas tanto na quimioprevenção quanto no tratamento de uma doença após esta já ter sido instalada. No geral, apesar do amplo uso, o conhecimento a respeito da composição fitoquímica, atividades biológicas, toxicidade e mecanismos de ação ainda são pouco exploradas. Neste contexto, *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) é conhecida como “poaia-branca” e encontrada praticamente em todos os continentes, aparecendo no Brasil, principalmente em regiões onde há atividades agrícolas. É utilizada popularmente no tratamento do diabetes, hemorroidas, eczemas, queimaduras, dentre outros. Apesar disso, poucos dados a respeito de sua constituição fitoquímica e sua ação farmacológica foram encontrados. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar compostos bioativos presentes nos extratos, através de diferentes métodos cromatográficos; determinar a capacidade antioxidante *in vitro*, utilizando os ensaios de DPPH, anti-hemólise e ORAC; avaliar parâmetros oxidativos como TBARS, EROs e ON; genotóxicos e citotóxicos como a viabilidade celular pelo método MTT, quantificação de dupla fita de DNA através do ensaio do PicoGreen® e de fita simples pelo método do DNA Cometa em leucócitos e PBMCs. Além de analisar a capacidade antiproliferativa em diferentes linhagens tumorais (A375, MCF-7, HeLa, HT-29 e U87) e não tumorais (3T3), e realizar análises de toxicidade aguda e em doses repetidas em modelo animal, seguindo protocolos da OECD. No *screening* fitoquímico foram identificados: heterosídeos antociânicos, gomas, mucilagens, taninos, amino-grupos, esteroides e/ou triterpenos, alcaloides, fenóis, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides. Através dos diferentes métodos cromatográficos utilizados, foram identificados quatorze polifenóis com destaque para a presença de rutina e ácido clorogênico. Alcaloides e terpenos também foram compostos do metabolismo secundário com destaque tanto em extratos das partes aéreas quanto das raízes. No doseamento dos metabólitos, houve diferença nas diferentes estações, sendo que as maiores concentrações de polifenóis totais ocorreram nos extratos de primavera, flavonoides no outono, porém sem diferir do inverno e da primavera e taninos foram encontrados em altas concentrações no verão. Quando os extratos foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante, as respostas foram diferentes nos métodos utilizados, apresentando pronunciado efeito antioxidante nos ensaios de anti-hemólise e ORAC. Em relação aos parâmetros oxidativos, genotóxicos e citotóxicos, alterações foram observadas principalmente nas concentrações mais elevadas. Na avaliação da capacidade antiproliferativa, o extrato de *R. brasiliensis* foi promissor, reduzindo a viabilidade celular em cerca de 95% em células de melanoma humano (A375) e foi observado que os fitoquímicos presentes no extrato foram capazes de ativar mecanismos que levaram as células à apoptose. No ensaio da toxicidade oral aguda e em doses repetidas, não houve mortalidade e os animais não apresentaram sinais de toxicidade durante o período dos tratamentos. Foram observadas alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos, que estão dentro dos padrões para a espécie. Assim, os resultados obtidos apresentaram as principais substâncias do metabolismo secundário vegetal responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas à espécie *R. brasiliensis*, demonstrando que os extratos são efetivos contra linhagens celulares tumorais, com maior efetividade contra A375. No entanto, nas condições na qual a pesquisa foi desenvolvida, os extratos apresentaram algumas alterações que podem estar indicando certo grau de toxicidade *in vitro* em células leucocitárias e em PBMCs. Ademais, os ensaios *in vivo* sugerem que a espécie é segura para uso pela população, porém mais estudos de toxicidade a longo prazo, são necessários para afirmar esses dados.

Palavras-chave: Poaia-branca. Compostos bioativos. Rubiaceae. Antioxidante. Antiproliferativo.

ABSTRACT

Richardia brasiliensis Gomes: PHYTOCHEMICAL COMPOSITION, BIOLOGICAL ACTIVITY AND TOXICITY

AUTHOR: Rafaela Castro Dornelles

ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann

Medicinal plants are used both in chemoprevention and in the treatment of a disease after it has already been installed. In general, despite the wide use, knowledge about the phytochemical composition, biological activities, toxicity and mechanisms of action are still poorly explored. In this context, *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae), it is known as “poaia-branca”, found in practically all continents, appearing in Brazil mainly in regions where there are agricultural activities. It is popularly used in the treatment of diabetes, hemorrhoids, eczema, burns, among others. Despite this, few data regarding its phytochemical constitution and its pharmacological action were found. Thus, the aim of this study was to identify bioactive compounds present in the extracts, through different chromatographic methods; to determine the antioxidant capacity *in vitro*, using the DPPH, anti-hemolysis and ORAC assays; to evaluate oxidative parameters such as TBARS, ROS and NO; genotoxic and cytotoxic such as cell viability by the MTT method, double-stranded DNA quantification by the PicoGreen® assay and single-stranded by the Comet DNA method in leukocyte and PBMCs. Besides to analyze the antiproliferative capacity in different tumoral (A375, MCF-7, HeLa, HT-29 and U87) and no-tumor (3T3) cell lines, and to perform acute and repeated dose toxicity analyses in an animal model, following OECD protocols. In the phytochemical screening, the following were identified: anthocyanin heterosides, gums, mucilages, tannins, amino groups, steroids and/or triterpenes, alkaloids, phenols, coumarins, organic acids and flavonoids. Through the different chromatographic methods used, fourteen polyphenols were identified, highlighting the presence of rutin and chlorogenic acid. Alkaloids and terpenes were also secondary metabolism compounds highlighted in both aerial and root extracts. In the determination of metabolites, there was a difference in the different seasons, with the highest concentrations of total polyphenols occurring in spring extracts, flavonoids in autumn, but without differing from winter and spring, and tannins were found in high concentrations in summer. When the extracts were submitted to the evaluation of the antioxidant capacity, the responses were different in the methods used, showing a pronounced antioxidant effect in the anti-hemolysis and ORAC assays. Regarding the oxidative, genotoxic and cytotoxic parameters, there were some changes, especially at higher concentrations. In the evaluation of the antiproliferative capacity, the extract of *R. brasiliensis* was promising, reducing cell viability by about 95% in human melanoma cells (A375) and it was observed that the phytochemicals present in the extract were able to activate mechanisms that led the cells to apoptosis. In the acute oral toxicity test and in repeated doses, there was no mortality and the animals did not show signs of toxicity during the treatment period. The changes in hematological and biochemical parameters found are within the standards for the species. Thus, the results obtained showed the main substances of secondary plant metabolism responsible for the biological activities attributed to the species *R. brasiliensis*, demonstrating that the extracts are effective against tumor cell lines, with greater effectiveness against A375. However, under conditions in which the research was performed, the extracts showed some alterations that may be indicating a certain degree of *in vitro* toxicity in leukocyte cells and in PBMCs. Moreover, *in vivo* tests suggest that the species is safe for use by the population, however, more long-term toxicity studies are needed to confirm these data.

Keywords: Poaia-branca. Bioactive compounds. Rubiaceae. Antioxidant. Antiproliferative.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Visão geral das principais vias de síntese do metabolismo secundário.....	24
Figura 2 - Partes aéreas de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes. Detalhe mostrando glomérulo com as brácteas foliáceas.....	27
Figura 3 - Figura esquemática demonstrando vias de sinalização induzidas por ERs. O estresse oxidativo ocorre quando há desbalanço redox entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes. As ERs interagem com algumas proteínas quinases que ativam fatores de transcrição por diferentes vias, levando à regulação de diferentes processos como por exemplo proliferação, diferenciação, angiogênese, apoptose.....	31
Figura 4 - Curva demonstrando o efeito hormético de uma substância fitoquímica.....	32

ARTIGO I

Fig S1 - Antioxidant activity of C.E. through the ORAC assay. (CES): Crude summer extract; (CEA): Crude autumn extract; (CEW): Crude winter extract; (CESP): Crude spring extract.....	69
Fig S2 - TBARS lipid peroxidation test in human leukocytes.....	70
Fig S3 - Result of the Nitric Oxide Test using Gries reagent in human leukocytes.....	71
Fig S4 -The relative concentration of free radicals at different concentrations of the crude extract of <i>R. brasiliensis</i>	72
Fig S5 - Cell viability of leukocytes measured by the MTT colorimetric assay after exposure to different concentrations of <i>R. brasiliensis</i>	73
Fig S6 -Determination of free dsDNA levels in the extracellular medium after exposure to different concentrations of <i>R. brasiliensis</i> after 24 h.....	74
Fig S7 - Alkaline comet assay for human leukocytes after exposure to different concentrations of <i>R. brasiliensis</i> extract.....	75

ARTIGO II

- Fig 1- Chromatogram of the extracts of aerial parts (peaks in blue) and roots (peaks in red) of *R. brasiliensis*, analyzed by UHPLC-ESI-HRFTMS.....85
- Fig 2 - Evaluation of cell viability by MTT colorimetric assay. (A) after 24h of incubation with crude extract of aerial parts of *R. brasiliensis* in cancer and healthy cells. A375 (human melanoma); HeLa (cervical cancer); MCF-7 (breast cancer); HT-29 (colorectal cancer); U87 (human glioblastoma); and 3T3 (murine fibroblast). (B) comparative antiproliferative effects on A375 cell line (human melanoma) after 24 and 72 h of incubation with the CEA. Data are expressed as mean \pm SD.....86
- Fig 3 - Annexin PE/7-AAD staining used to assess the mode of cell death in A375 cells (human melanoma), after 24 h of incubation with CEA at the final concentrations of 75, 125, and 250 μ g/ml. Data are expressed as mean \pm SD.....87
- Fig 4 - *In vitro* toxicity evaluation of PBMC cells exposed to different concentrations of CEA for 24 h. (A) cell viability by MTT colorimetric assay; (B) total ROS levels; (C) determination of NO levels; (D) quantification of extracellular dsDNA. NC: negative control; PC.: positive control. *Different from the negative control. Data are expressed as mean \pm SD.....88

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table S1 - Dosing of total polyphenols, flavonoids, and tannins in the four crude extracts of <i>R. brasiliensis</i>	66
Table S2 -Compounds identified and quantified by UHPLC-ESI-MS/MS in the four crude extracts of <i>R. brasiliensis</i>	67
Table S3 - Antioxidant capacity of crude extracts of <i>R. brasiliensis</i>	68

ARTIGO II

Table 1 - Antiproliferative activity of CEA expressed as IC ₅₀ (µg/mL) and selectivity index (SI)values.....	86
Table 2 - Hematological and biochemical parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at 200, 400, and 600 mg/kg doses.....	89
TableS1- Putative compounds in the hydroethanolic extracts of <i>Richardia brasiliensis</i> (Rubiaceae) by UHPLC-HRFTMS analysis, in positive mode ionization.....	101
TableS2 - Body and organ weight and relative organ weight (%) after acute oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of CEA in female rats.....	113
TableS3 - Hematological parameters of female rats after oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of the CEA (test) and the vehicle (control).....	113
TableS4- Biochemical parameters of female rats after acute oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of CEA.....	114
TableS5 - Body, organ weight and relative weight (%) after repeated doses (28 days) with the administration of CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg in female and male rats.....	114
TableS6 - Hematological parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.....	115
TableS7 - Biochemical parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.....	116

TableS8 - Evaluation of lipid peroxidation and carbonylated proteins in the kidney and liver of female and male rats after 28 days of treatment with CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.....	117
TableS9 - Evaluation of the enzymatic activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the kidney and liver of female and male rats after 28 days of treatment with CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OH	Radical hidroxila
$^1\text{O}^2$	Oxigênio singlete
3T3	Fibroblasto murino
A375	Melanoma humano
AAA	Aminoácidos aromáticos
AAPH	(2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto)
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área sob a curva
AST	Aspartato aminotransferase
AE	Extrato aquoso
Abs	Absorbância
ALP	Fosfatase alcalina
BCI-2	Proteína do linfoma de células B
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
CRE	Creatinina
CEA	Extrato bruto das partes aéreas
CN/NC	Controle negativo
CP/PC	Controle positivo
CHCM	Concentração média de hemoglobina corpuscular
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRE	Creatinina
CHOL	Colesterol total
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DCFH-DA	2'-7'- diclorofluoresceína diacetato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de cadeia dupla
DP/SD	Desvio padrão
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DL ₅₀	Dose letal mediana

ID/DI	Índice de dano
DNP	Dicionário de Produtos Naturais
DMEM	Meio Eagle - Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E4P	Eritrose-4-fosfato
EB/CE	Extrato bruto
EBI/CEW	Extrato Bruto de Inverno
EBO/CEA	Extrato Bruto de Outono
EBP/CESP	Extrato Bruto de Primavera
EBRb/CERb	Extrato Bruto de <i>Richardia brasiliensis</i>
EBV/CES	Extrato Bruto de Verão
ERs	Espécies reativas
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO/ROS	Espécies reativas de oxigênio
ERS	Espécies reativas de enxofre
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBS	Soro Fetal Bovino
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GGT	Gamma glutamil transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HeLa	Câncer cervical
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HT-29	Câncer colorretal
HE	Extrato etanólico
HGB	Hemoglobina
HCT	Hematócrito
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose
IC ₅₀	Concentração inibitória
IPP	Difosfato de isopentenil
LPO	Peroxidação lipídica

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEAC	Laboratório de Análises Clínicas
MCF-7	Câncer de mama
MDA	Malondialdeído
MEP	2-C metil-D-eritritol-4-fosfato
MP	Metabolismo primário
MS	Metabolismo secundário
MTT	Brometo de tetrazolio 2,5-Diphenyl-3,-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)
MVA	Mevalonato
MVC	Volume corpuscular médio
ON/NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina
PLT	Plaquetas
PPT	Proteínas plasmáticas totais
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RCB	Glóbulos vermelhos totais
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SPE	Extração em fase sólida
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SMDB	Herbário do Departamento de Biologia
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TE	Equivalente de Trolox
TG	Triglicerídeos

TP	Proteínas séricas totais
TOP I	Topoisomerase
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UFN	Universidade Franciscana
UHPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência por Ionização com Eletrospray acoplado a Massas
UHPL-ESI-HRFTMS	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho combinada com Espectrometria de Massa de Alta Resolução
UV	Ultravioleta
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
U87	Glioblastoma humano
URE	Ureia
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
WBC	Glóbulos brancos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	METABOLISMO VEGETAL.....	21
3.2	A ESPÉCIE <i>Richardia brasiliensis</i> GOMES.....	25
3.3	FAMÍLIA BOTÂNICA RUBIACEAE.....	27
3.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	29
3.4.1	Ação Antioxidante e pró-oxidante.....	29
3.4.2	Ação anticâncer e Apoptose.....	33
3.5	TOXICIDADE.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	39
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS.....	39
4.3	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ FITOQUÍMICA.....	40
4.4	DOSEAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	40
4.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM UHPLC-ESI-MS/MS.....	41
4.5.1	Determinação de polifenóis por UHPLC-ESI-MS/MS.....	41
4.6	ANÁLISE FITOQUÍMICA POR UHPLC-ESI-HRFTMS.....	42
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
4.7.1	Ensaio do DPPH.....	42
4.7.2	Ensaio da anti-hemólise.....	43
4.7.3	Ensaio ORAC.....	43
4.8	PREPARO DAS CULTURAS CELULARES.....	43
4.8.1	Coleta de sangue e preparo da cultura de Leucócitos.....	44
4.8.2	Obtenção de PBMCs.....	44
4.9	PARÂMETROS OXIDATIVOS.....	45
4.10	PARÂMETROS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS.....	45
4.11	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	46
4.11.1	Cultura e tratamento celular.....	46

4.11.2 Viabilidade Celular.....	47
4.11.3 Apoptose.....	47
4.12 TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	48
4.13 TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	48
4.13.1 Animais experimentais.....	48
4.13.2 Toxicidade aguda.....	48
4.13.3 Toxicidade em doses repetidas.....	49
4.13.4 Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	49
4.13.5 Parâmetros oxidativos.....	50
4.13.5.1 <i>Proteínas carboniladas e peroxidação lipídica.....</i>	50
4.13.5.2 <i>Atividade enzimática.....</i>	50
4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
5 RESULTADOS.....	51
5.1 ARTIGO I.....	52
5.2 ARTIGO II.....	76
6 DISCUSSÃO GERAL.....	119
7 CONCLUSÃO.....	124
8 LIMITAÇÕES.....	125
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	125
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXO I – COMPROVANTE DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO (SisGen).....	141
ANEXO II – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO (CEUA).....	142
ANEXO III – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO (ARTIGO I).....	143
ANEXO IV – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO (ARTIGO II).....	144

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em introdução, revisão bibliográfica, objetivos, materiais e métodos e resultados (artigo I e artigo II), discussão geral, conclusões, limitações, perspectivas futuras, referências e anexos. A seção introdução traz de maneira geral, a importância do estudo com plantas medicinais, uma breve descrição da espécie *Richardia brasiliensis* e a justificativa do porquê pesquisamos esta espécie. A seção revisão bibliográfica aborda conceitos sobre o metabolismo vegetal, a descrição da espécie, a família botânica e atividades biológicas pesquisadas ao longo deste estudo. Os materiais e métodos descrevem cada metodologia utilizada ao longo do estudo. Os resultados foram compilados e divididos em: **artigo I**, publicado no periódico **Natural Product Research** na forma de “short communication”, intitulado “Phytochemical characterization, antioxidant capacity, and *in vitro* toxicity of *Richardia brasiliensis* Gomes crude extracts” e **artigo II**, publicado no periódico **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, intitulado “*Richardia brasiliensis* Gomes: phytochemical characterization, antiproliferative capacity and *in vitro* and *in vivo* toxicity”. A seção discussão geral, reúne os resultados descritos em ambos artigos e suas implicações. A conclusão traz os princípios achados da pesquisa. As referências contemplam citações que foram utilizadas para compor todos os demais tópicos da tese. No item limitações, são apresentadas algumas das dificuldades encontradas ao longo da pesquisa e nas perspectivas futuras demonstramos algumas ideias de complementação do estudo. Na seção anexos, encontra-se o comprovante de cadastro de acesso ao Patrimônio Genético da espécie *R. brasiliensis*, a aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para o estudo *in vivo* com animais, o comprovante de Publicação do artigo I e artigo II.

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas sempre esteve incluída na história evolutiva da humanidade. Junto com a carne, formavam a base alimentar do homem pré-histórico, além de serem utilizadas na construção de seus abrigos, obtenção de suas roupas, ferramentas de defesa, utensílios domésticos e, inconscientemente, usadas no tratamento de seus enfermos (NUNES *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2017).

Com o passar das eras, as informações empíricas foram sendo transmitidas oralmente para as gerações seguintes e com o surgimento da escrita, começaram a ser arquivados e documentados (KARUNAMOORTHY *et al.*, 2013; TRESINA *et al.*, 2021). A partir disso, o conhecimento tradicional foi sendo acumulado ao longo dos anos e até mesmo no século XXI essa prática ainda é explorada e muito utilizada. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), 80% da população que vive em regiões como África, Ásia e América Latina, fazem uso da medicina tradicional para atender suas demandas básicas de saúde.

Atualmente, a pesquisa com plantas medicinais tem destaque no cenário mundial, pois parte da população continua a fazer uso desse recurso como único tratamento e, além disso, grande parte dos medicamentos utilizados na farmacoterapia são provenientes de substâncias naturais, dentre eles as plantas. Exemplo disso são os fármacos utilizados para o tratamento do câncer, no qual 60% dos agentes anticâncer conhecidos, são obtidos a partir de fontes naturais (CRAGG; NEWMAN, 2005; SOUZA *et al.*, 2018). Outro fator relevante das plantas medicinais é seu uso na dieta humana, pois possuem uma grande diversidade de fitonutrientes que contribuem na prevenção de várias doenças crônicas e degenerativas, atuando como agentes quimiopreventivos (CHIKARA *et al.*, 2018).

Apesar do amplo uso, grande parte das espécies vegetais ainda possuem suas características químicas e farmacológicas e seus mecanismos de ação completamente desconhecidos. Dessa forma, estudos que exploram a constituição fitoquímica podem ser úteis na investigação dos princípios bioativos podendo levar ao desenvolvimento de novas drogas e a determinação de suas ações biológicas frente aos mais diversos organismos, justificando seu uso na terapia medicinal alternativa (FARAG *et al.*, 2020; ALQETHAMI; ALDHEBIANI, 2021). Logo, a utilização de plantas ou qualquer preparação à base delas, requerem um mínimo de controle de qualidade, de forma que podem apresentar certo grau de toxicidade devido sua composição química (CODIGNOTO *et al.*, 2017).

Rubiaceae é uma família botânica que se destaca entre as plantas medicinais, pois várias espécies são usadas com fins farmacológicos devido à presença de metabólitos bioativos potenciais como iridoides, antraquinonas, triterpenos, alcaloides indólicos e outras classes de substâncias. Como exemplo de Rubiaceae com importância medicinal, temos espécies pertencente ao gênero *Cinchona sp.* que são fontes de quinino; espécies de *Uncaria*, como *Uncaria tomentosa* no qual são muito utilizadas na medicina popular; espécies de *Psychotria sp.* as quais possuem substâncias ativas com ação no sistema nervoso central (MARTINS; NUNEZ, 2015). Além da grande diversidade de substâncias químicas encontradas nos diferentes órgãos da planta, as espécies dessa família, possuem ampla distribuição, sendo encontradas em praticamente todos os continentes (MASEVHE *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2017).

Richardia brasiliensis Gomes é um exemplar pertence à família Rubiaceae, rica em moléculas ativas de interesse medicinal como polifenóis, alcaloides, esteroides, triterpenos, cumarinas e outros (LORENZI; MATOS, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Esta espécie é conhecida popularmente como poaia branca, poaia do campo, ervaço e pode ser encontrada em praticamente todo o território nacional, desenvolvendo-se principalmente em regiões onde há a presença de culturas anuais cultivadas.

A população a utiliza no tratamento da êmese e diabetes, como anti-hemorroidal, expectorante, vermífuga, em eczemas e no tratamento de queimaduras já, pesquisas científicas demonstraram que seus extratos possuem atividade antibacteriana e fungicida (PINTO, 2008; FIGUEIREDO, 2005; TENÓRIO-SOUZA, 2009; CANALE, 2012; MORAIS *et al.*, 2013). Apesar disso, a espécie ainda é pouco explorada no que se refere a suas ações terapêuticas e percebe-se uma grande lacuna nos estudos científicos referentes a composição química e os possíveis efeitos farmacológicos no organismo.

Dessa forma, devido à grande importância dos estudos com plantas medicinais e os produtos provenientes delas, este trabalho com *Richardia brasiliensis* Gomes teve como principais objetivos, caracterizar substâncias ativas de interesse medicinal da espécie e avaliar atividades farmacológicas dos extratos brutos como sua capacidade antioxidante, ação antiproliferativa, além de avaliar a toxicidade em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e quantificar substâncias fitoquímicas, determinar atividades biológicas e avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* dos extratos brutos de *Richardia brasiliensis* Gomes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos brutos de *R. brasiliensis* coletadas em diferentes estações do ano;
- Realizar o *screening* fitoquímico em extratos aquosos e hidroetanólico;
- Dosar polifenóis totais, flavonoides e taninos nos extratos hidroetanólico obtidos nas diferentes estações do ano;
- Quantificar metabólitos bioativos nos extratos hidroetanólico obtidos nas diferentes estações do ano;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* nos extratos hidroetanólico obtidos nas diferentes estações do ano;
- Avaliar parâmetros oxidativos nos extratos hidroetanólico obtidos nas diferentes estações do ano;
- Avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade *in vitro* nos extratos hidroetanólico obtidos nas diferentes estações do ano;
- Avaliar o potencial antitumoral em modelo *in vitro*, do extrato bruto de *R. brasiliensis*;
- Determinar a toxicidade aguda *in vivo*, do extrato bruto de *R. brasiliensis*;
- Determinar a toxicidade em doses repetidas *in vivo*, do extrato bruto de *R. brasiliensis*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 METABOLISMO VEGETAL

O metabolismo dos vegetais engloba uma rede de reações, muito mais complexas que outros organismos, pois além das rotas do metabolismo primário (MP), há a síntese de compostos do metabolismo secundário (MS) (AHARONI; GALIL, 2011). O MP está relacionado a reações bioquímicas essenciais para a manutenção da vida nas quais macromoléculas universais como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos estão envolvidos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já o MS ou metabolismo especializado, é o resultado de milhões de anos de evolução como estratégia química das plantas para sua adaptação e sobrevivência (ROCKENBACH *et al.*, 2018), uma vez que atuam na proteção contra infecções

microbianas e virais, herbivoria, radiação UV, atração de polinizadores, alelopatia e sinalização (SANTOS, 2007; AKULA; RAVISHANKAR, 2011).

A síntese de substâncias do MS vegetal é desencadeada pela ação de fatores bióticos e abióticos, sendo que os metabólitos secundários são produzidos sob condições ambientais específicas, ou seja, as vias sintéticas são ativadas somente durante alguns estágios de crescimento e desenvolvimento da planta ou em períodos de estresse causado por limitações nutricionais e ataques microbiológicos (SANTOS, 2007).

As substâncias resultantes do MS apresentam-se em baixas concentrações, cerca de menos de 1% do peso seco da planta, e são restritos a algumas espécies botânicas definidas, sintetizados em tecidos, órgãos e em determinados estágios de desenvolvimento da planta e muitas vezes armazenados em locais diferentes de onde foram sintetizados. São caracterizados por possuírem estrutura complexa, o que se reflete em uma grande diversidade de compostos de baixo peso molecular (ROCKENBAK *et al.*, 2018; FANG; FERNIE; LUO, 2019).

A síntese dos metabólitos secundários é influenciada por diferentes vias e reações resultantes do MP, como por exemplo, via da glicólise, do ciclo da pentose fosfato, do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), de aminoácidos alifáticos, da via do chiquimato ou ainda dos aminoácidos aromáticos (figura 1). E, de acordo com suas estruturas, são divididos em três grupos principais: compostos fenólicos, terpenoides e compostos contendo nitrogênio ou enxofre como os alcaloides e glucosinolatos, respectivamente (AHARONI; GALIL, 2011; ALQETHAMI; ALDHEBIANI, 2021; WANG *et al.*, 2022).

No geral, compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas superiores, principalmente porque são moléculas que estão envolvidas na síntese da lignina (BOURGAUD *et al.*, 2001). Possuem como principais características a presença de pelo menos um anel aromático ligado a uma hidroxila (figura 1A) e são derivados dos fenilpropanoides, provenientes das vias biossintéticas do ácido chiquímico e da via do ácido mevalônico (MONDO; SANSONE; BRUNET, 2022).

A classificação é baseada no número de anéis de fenol, de elementos estruturais que se ligam a esses anéis e na presença dos diferentes substituintes (BRAICU *et al.*, 2020). De acordo com sua estrutura, são classificados como ácidos fenólicos, flavonoides e não-flavonoides e variam de compostos simples com um único anel aromático como o ácido benzóico e ácido cinâmico; derivados dos ácidos carboxílicos aromáticos; estruturas contendo dois anéis aromáticos como cumarinas e estilbenos e metabólitos mais complexos como flavonoides com

três anéis e estruturas poliméricas de taninos (ANGELO; JORGE, 2007; ZHANG; TSAO, 2016; DAS *et al.*, 2019; CORSO *et al.*, 2020).

Devido à grande diversidade de estruturas químicas, as substâncias fenólicas representam uma das maiores categorias de compostos das plantas, conseqüentemente apresentando as mais variadas funções biológicas, que incluem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticancerígenas, além de atuarem contra doenças crônicas como o diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MOCAN *et al.*, 2016; CURTI *et al.*, 2017).

Um dos representantes mais comuns dentre os polifenóis, são os flavonoides com muitas funções para plantas e animais. Estão divididos em nove subclasses conforme os níveis de oxidação e a conformação do anel aromático, e estão envolvidos principalmente com a defesa da planta contra a radiação UV e ataques de herbívoros. Muitos dos flavonoides conhecidos possuem benefícios para a saúde humana, tendo como principais ações farmacológicas a atuação na redução da inflamação, a capacidade em atuar como poderosos antioxidantes, inibir a angiogênese e regular a apoptose em células cancerígenas (BIRCHFIELD; MCINTOSH, 2020).

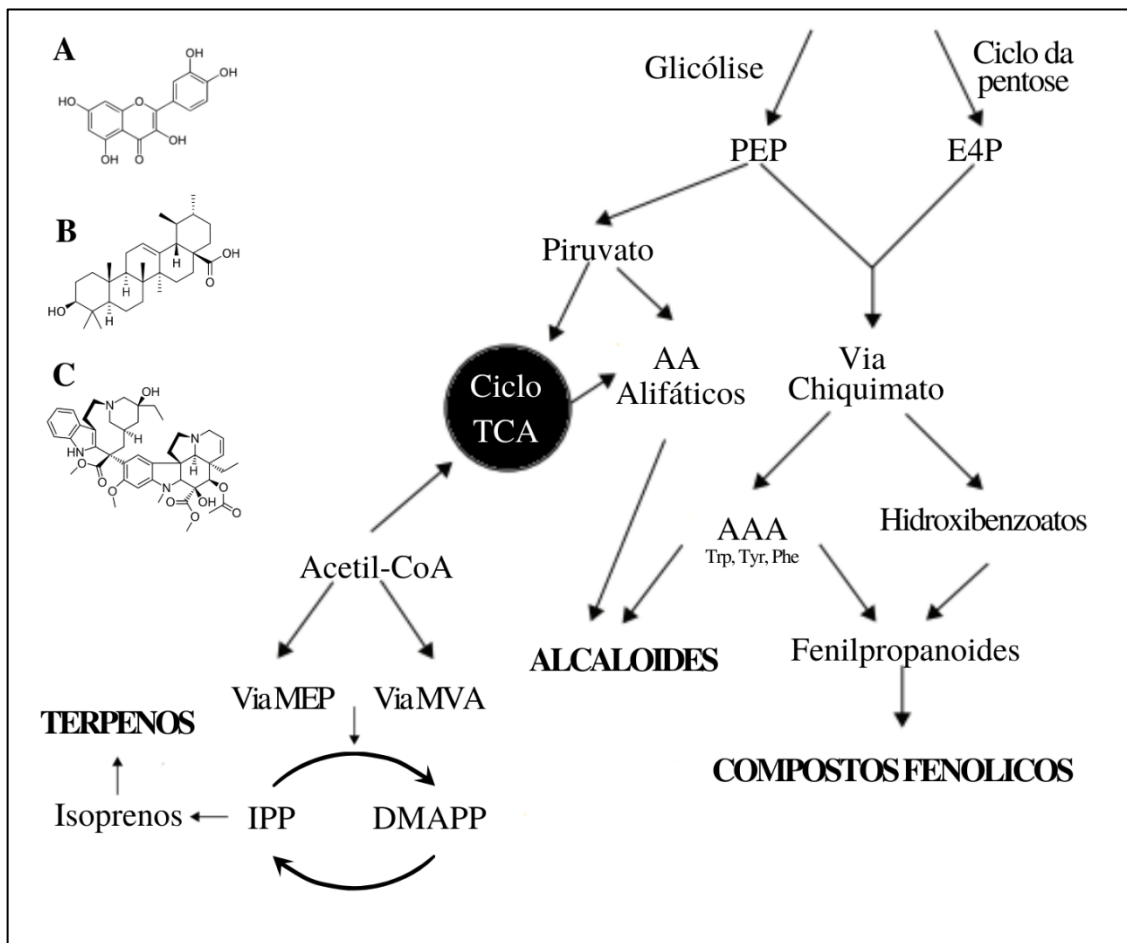
Os terpenos (figura 1B), a maior categoria de MS, são compostos constituídos a partir de unidades de isoprenos de cinco carbonos e classificados em monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e politerpenos (BRAICU *et al.*, 2020). São sintetizados a partir de dois precursores comuns, o difosfato de isopentenil (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), ambos gerados de duas vias diferentes e independentes: através da via do ácido mevalônico ou mevalonato que ocorre em microssomas e citoplasma e a via do fosfato de metileritritol que ocorre em plastídios (KOPACZYK *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; WENKAI *et al.*, 2021).

Essas substâncias possuem uma ampla gama de ações farmacológicas, sendo usadas como anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras e anticâncer (FAKHRI *et al.*, 2020). Dentre os terpenos, o ácido ursólico e o ácido oleanólico são ácidos triterpênicos pentacíclicos que ocorrem naturalmente em várias espécies e demonstraram possuir potente ação anticâncer (YAN *et al.*, 2010). Esses triterpenos também são usados como hepatoprotetores, com efeitos benéficos para o fígado através de sua ação antioxidante e anti-inflamatória (LIU, 2005).

Os alcaloides são uma terceira classe de substâncias resultantes do metabolismo secundário, com importantes ações farmacológicas como anti-hipertensivos, sedativos, antitumorais, anticolinérgicos, anestésicos, psicoativos, analgésicos, dentre outros. São

compostos heterocíclicos, normalmente derivados de aminoácidos; metabólitos como terpenos e esteroides também atuam na conformação do esqueleto final (SANTOS, 2007). Uma das principais características da molécula é a presença de um ou mais átomos de nitrogênio em sua estrutura (figura 1C), o que influencia em suas atividades biológicas (ROSALES *et al.*, 2020).

Figura 1 – Visão geral das principais vias de síntese do metabolismo secundário.



PEP: fosfoenolpiruvato; E4P: eritrose-4-fosfato; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico; AAA: aminoácidos aromáticos; MEP: 2-C metil-D-eritritol-4-fosfato; MVA: mevalonato; IPP: difosfato de isopentenil; DMAPP: difosfato de dimetilalil; Trp: triptofano; Tyr: tirosina; Phe: fenilalanina. A: estrutura química de um composto fenólico (quercetina); B: estrutura química de um terpeno (ácido ursólico); C: estrutura química de um alcaloide (vimblastina).

Fonte: Figura adaptada de AHARONI & GALILI (2011) e WANG *et al.* (2022).

As principais classes de alcaloides, de acordo com o sistema anelar presente na molécula, são: piridinas, indólicos, tropânicos, quinolínicos, isoquinolínicos, fenantrenos,

feniletilaminas, purinas, imidazóis, aporfinas, pirrolizidínicos, indolizidina, piperidinas e alcaloides pirrolidínicos (MORA-VÁSQUEZ *et al.*, 2022).

Possuem distribuição esparsa no reino vegetal e contribuem para a quimiotaxonomia, pois são específicos para gênero e espécie (BOURGAUD *et al.*, 2001). Nas plantas, essas substâncias são produzidas com o intuito de autodefesa e exibem toxicidade contra organismos herbívoros. Possuem ações farmacológicas importantes como sedativa, devido à presença de poderosas substâncias que atuam no sistema nervoso central (ALQETHAMI; ALDHEBIANI, 2021). Alguns alcaloides possuem propriedades antitumorais, como a camptotecina, vincristina, vimblastina, berberia e outros e, seus principais alvos estão na replicação do DNA e na síntese de proteínas que estimulam a apoptose (BRAICU *et al.*, 2020).

Apesar do amplo uso e da grande importância dos compostos ativos provenientes do metabolismo secundário vegetal, muitas espécies ainda são pouco exploradas quanto sua constituição fitoquímica e suas ações farmacológicas. Nesse contexto, *Richardia brasiliensis* é uma espécie recorrentemente citada pela população para o tratamento de vários sintomas, no entanto ainda há uma grande lacuna no que se refere a sua composição química e suas ações biológicas.

3.2 A ESPÉCIE *Richardia brasiliensis* GOMES

Richardia brasiliensis Gomes, espécie pertencente à família Rubiaceae, é conhecida popularmente por poaia branca, poaia-do-campo, ervaço, ipeca, ipecacuanha ou trevo mexicano (DELPRETE *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006; WANDERLEY *et al.*, 2007; BORHIDI, 2012; GALLON *et al.*, 2018). É uma espécie cosmopolita com registros no continente Australiano, Estados Unidos e regiões da América Central como o Caribe. Na América do Sul é encontrada desde a Cordilheira dos Andes até a Costa do Atlântico e, no Brasil, ocorre de forma descontínua em todos os estados, desenvolvendo-se principalmente em locais com intensa atividade agrícola, como as regiões centro-oeste, sudeste e sul (LORENZI; MATOS, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; TROPICOS, 2017; GALLON *et al.*, 2018).

As primeiras descrições da espécie foram realizadas por Bernardino António Gomes e publicada em “Memoria sobre la Ipecacuanha fusca do Brasil, ou Cipó das Nossas Boticas” em Lisboa no ano de 1801, no qual, com base em suas características morfológicas, classificou a espécie como pertence à ordem Gentianales, família Rubiaceae, subfamília Rubioideae, tribo

Spermacoaceae, gênero *Richardia* (DELPRETE *et al.*, 2004; LORENZI; MATOS, 2008; TROPICOS, 2017).

São plantas perenes, coletadas com flores quase todo o ano; com hábitos herbáceos; desenvolvimento prostrado; geralmente com raízes adventícias; ramificada e caule viloso. As características que definem a espécie são a presença de um caule sub-suculento, com aproximadamente 40 a 60 cm de comprimento, densamente hirsuto-pubescente; bainha estipular curta; folhas opostas, membranáceas a cartáceas, com pubescências em ambas as faces, ápice e base agudos. As inflorescências encontram-se em glomérulos, rodeados por 2, 4 ou 6 brácteas foliáceas. As flores são geralmente hexâmeras, porém às vezes podem ser tetrâmeras ou pentâmeras. As sépalas normalmente encontram-se em número de 6. A corola é branca ou rosada, com um anel de pelos em sua face interna. Os estames encontram-se em número de 6, exsertos e o ovário é ínfero, trilocular, com um óvulo por lóculo. O fruto é do tipo esquizocarpo (PORTO *et al.*, 1977; DELPRETE *et al.*, 2004, 2005; LORENZI; MATOS, 2008).

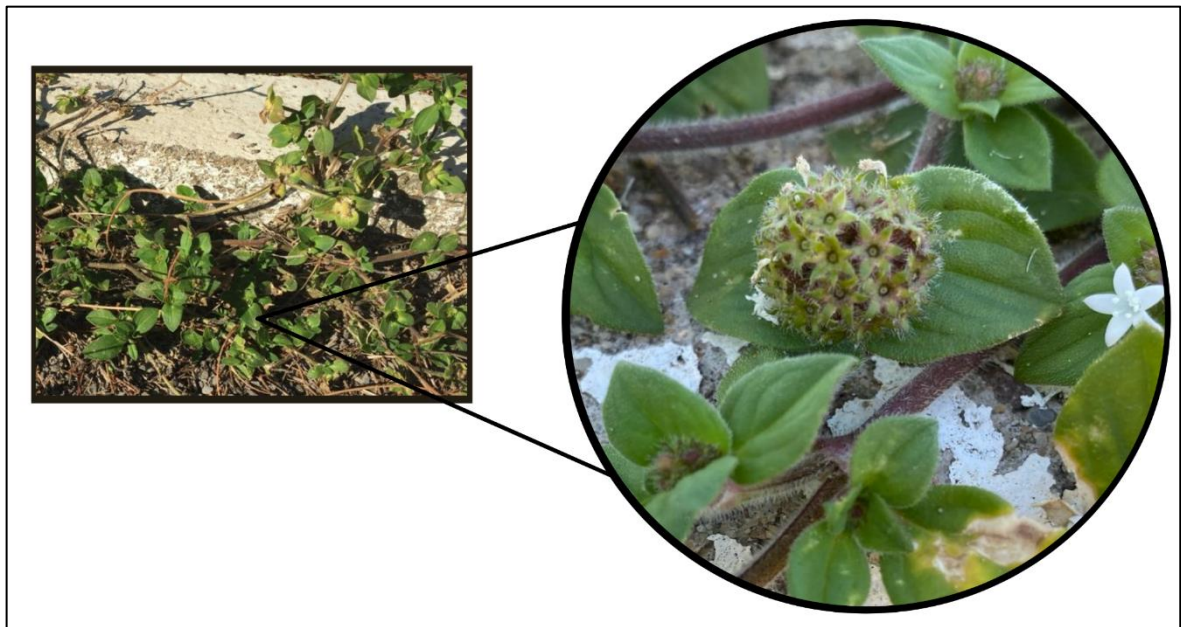
Figueiredo (2005) observou que as folhas de *R. brasiliensis* são anfiestomáticas e que tanto folhas quanto caule são densamente recobertos por tricomas tectores (figura 2). Ambas características anatômicas são muito comuns em espécies invasoras por aumentar a taxa fotossintética possibilitando a adaptação da espécie ao ambiente.

R. brasiliensis é mais conhecida e pesquisada porque se desenvolve em meio a outras culturas e, assim, compete por espaços e recursos nutricionais. No entanto, devido ao seu uso popular na medicina tradicional e a presença de importantes compostos do metabolismo vegetal, alguns estudos foram desenvolvidos com fins fitoquímicos (PINTO *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; TENÓRIO-SOUZA, 2009; TENÓRIO-SOUZA *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2013). Entretanto, ainda há uma grande lacuna em relação a dados farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade referentes a essa espécie.

Na medicina popular, infusos e decoctos das partes aéreas e raízes são utilizadas como antiemética, antidiabética, anti-hemorroidal, expectorante, vermífuga, empregada na cura de eczemas e no tratamento de queimaduras. Pesquisas científicas (CANALE, 2012; TROJAN-RODRIGUES *et al.*, 2012) demonstraram que o extrato etanólico apresentou capacidade antioxidante *in vitro*, atividade antifúngica contra importantes fitopatógenos e suas frações foram usadas como antimicrobianas frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2013). De acordo com a literatura pesquisada, as principais substâncias ativas identificadas na espécie foram cumarinas, flavonoides, esteroides, triterpenos, alcaloides e resinas (FIGUEIREDO 2005; FIGUEIREDO *et al.*, 2009, 2010;

WONG *et al.*, 2015). Foram isolados nos extratos e frações: β -sitosterol, uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol, cedrelopsina, norbraylina, braylina, cumarielelefina, canferol, ácido oleanólico, ácido ursólico, isorametina-3-O-rutinosídeo, ácido p-hidroxi-benzoico, ácido m-metoxi-p-hidroxi-benzóico e escopoletina (TENÓRIO-SOUZA, 2009; PINTO *et al.*, 2008; MATIAS *et al.*, 2018).

Figura 2. Partes aéreas de *Richardia brasiliensis* Gomes. Detalhe mostrando glomérulo com as brácteas foliáceas.



Fonte: autora

3.3 FAMÍLIA BOTÂNICA RUBIACEAE

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias botânicas dentre as angiospermas em números de espécies e diversidade química, possuindo aproximadamente 12.000 espécies distribuídas em 576 gêneros. Baseados em estudos filogenéticos moleculares, atualmente, Rubiaceae é subdividida em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae (DELPRETE; JARDIM, 2012; ADEWOLE *et al.*, 2021).

As espécies são encontradas nas mais diversas formas, desde árvores, arbustos, ervas trepadeiras, epífitas, herbáceas, espécies lenhosas até algumas lianas (DELPRETE *et al.*, 2004; PEREIRA, 2007; WANDERLEY *et al.*, 2007; BORHIDI, 2012). Os representantes são cosmopolitas e a distribuição ocorre em diferentes formações vegetacionais, destacando-se em

quase todos os tipos de ambientes, aparecendo entre as espécies mais abundantes no sub-bosque de florestas neotropicais e apresentando importante papel na composição da vegetação de regiões quentes (PEREIRA *et al.*, 2006; MIATELO, 2008; SOUZA; LORENZI, 2012).

Alguns dos metabólitos bioativos encontrados são usados como marcadores quimiotaxonômicos para a identificação de gênero e subfamílias, dentre eles, iridoides, antraquinonas e alcaloides indólicos. Além desses, terpenos (diterpenos e monoterpenos), outras subclasses de alcaloides, flavonoides e derivados fenólicos também são comuns nos espécimes representantes. Dentre as subfamílias, a Rubioideae é a que possui a maior diversidade química, e espécies dessa subfamília são fontes importantes de antraquinonas. Também são encontrados em grandes quantidades alcaloides indólicos e iridóides devido a não especificidade das vias metabólicas (COELHO *et al.*, 2006; CHOUDHURY *et al.*, 2012; MARTINS; NUNEZ, 2015; ADEWOLE *et al.*, 2021).

Por possuírem expressivo número de componentes químicos, a família das rubiáceas detém forte potencial biológico, com a descoberta de substâncias inéditas (SOUZA *et al.*, 2013). São utilizadas como ornamentais, alimentícias e no tratamento e cura de doenças, destacando-se como antiproliferativas, antissifilíticas, antiasmáticas, antianêmicas, antiangiogênicas, anti-inflamatórias e antioxidantes (COELHO *et al.*, 2006; PAIVA *et al.*, 2009; NETO; PEIXOTO, 2012). Na medicina tradicional são usadas no tratamento de asma, bronquite e pneumonia, como diuréticas, anti-inflamatória, antiviral, antirreumáticas, antidiabética e antiespasmódica (KAROU *et al.*, 2011; CODIGNOTO *et al.*, 2017).

Algumas espécies possuem propriedades biológicas bem documentadas como por exemplo, *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. conhecida como “unha-de-gato”, muito usada na medicina tradicional no tratamento de câncer, artrite, asma, úlcera gástrica e inflamação; espécies de *Cinchona*, da qual é obtido o alcaloide quinino utilizado no tratamento da malária e espécies de *Psychotria*, que possuem alcaloides utilizados como analgésicos (VIEGAS JR *et al.*, 2006; VALENTE *et al.*, 2006; MESA-VANEGAS *et al.*, 2013; MOURA; MARUO, 2014; MENDONÇA *et al.*, 2015). Além dessas, muitas outras espécies de Rubiaceae são utilizadas no tratamento de eczemas, distúrbios digestivos, doenças venéreas, antiproliferativas, hipotensoras, imunoestimulantes, relaxante muscular, antifúngicas e anti-leishmanicida (THOMAS *et al.*, 2017; ADEWOLE *et al.*, 2021). Outro representante de destaque é a espécie *Coffea arabica* com importância econômica, alimentícia e medicinal, rica em substâncias ativas como o ácido clorogênico e a cafeína, os quais possuem efeitos sobre o sistema nervoso e ação antioxidante, anticarcinogênica e propriedades hepatoprotetoras (MUNYENDO *et al.*, 2021;

ONTAWONG *et al.*, 2021).

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.4.1 Ação antioxidante e pró-oxidante

Radicais livres são partículas altamente reativas que perderam um elétron em sua última camada eletrônica, tornando a molécula desequilibrada do ponto de vista eletroquímico, instável bioquimicamente e reativas. Ao tentar recuperar sua estabilidade, ocorre a captura violenta de um elétron de outra molécula neutra e esta, por sua vez, transforma-se em um radical livre. A célula, a nível molecular, perde suas funções básicas e permanece pronta para atacar outras células e mudar suas funções. Assim, uma cadeia descontrolada de reações bioquímicas que danificam o organismo é gerada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BUTNARIU, 2012).

A formação endógena de espécies reativas é uma consequência natural do metabolismo aeróbico e ocorre através de reações bioquímicas normais que incluem radicais envolvidos na cadeia respiratória mitocondrial, fagocitose, síntese de prostaglandinas, sistema do Citocromo P450, dentre outros (SEIFRIED *et al.*, 2007; AHMADINEJAD *et al.*, 2017). A produção exógena está relacionada ao aumento da exposição a ambientes hostis como raios UV, radiação ionizante, poluição e a altos níveis de xenobióticos como fumaça do cigarro, álcool, metais, drogas, solventes e alimentos que, ao penetrarem no corpo por diferentes rotas, reagem com o oxigênio e são decompostos em radicais livres (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; NIMSE; PAL, 2015).

Os átomos altamente reativos ou espécies reativas (ERs) gerados, derivam de três elementos principais: oxigênio, nitrogênio e enxofre, formando espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroperoxila (HO_2^*), radical hidroxila (*OH), óxido nítrico (ON), oxigênio singlete (1O_2) e compostos não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl), que não possuem elétrons livres; espécies reativas de nitrogênio (ERN), formando peroxinitrito ($ONOO^-$); e espécies reativas de enxofre (ERS) que são facilmente formados pelas reações de EROs com tióis (CAROCHO; FERREIRA, 2013; NIMSE; PAL, 2015).

ERs possuem duplo papel, como compostos tóxicos e benéficos, e o delicado equilíbrio entre seus efeitos antagônicos é claramente um aspecto vital importante (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). Níveis basais de ERs estão associados a importantes eventos moleculares

tais como a cascata de sinalização celular, a regulação das funções fisiológicas, a indução de diferenciação celular, a ativação da apoptose e a estimulação do transporte da glicose. Dessa forma, ERs possuem papel importante como mensageiros secundários que regulam a sobrevivência celular e as vias de proliferação (VASCONCELOS *et al.*, 2007; CHIKARA *et al.*, 2018).

O acúmulo de ERs acima de níveis considerados normais ao organismo e a diminuição da capacidade de proteção antioxidante causa o chamado estresse oxidativo, no qual moléculas altamente reativas são capazes de reagir com macromoléculas causando danos irreversíveis à célula, desencadeando fatores responsáveis pela sobre expressão de genes oncogenes, geração de compostos mutagênicos, ativação de atividades aterogênicas e formação de placas senis. Como consequência tem-se o desenvolvimento de graves doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos, renais, hepáticos, hipertensão e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (VASCONCELOS *et al.*, 2007; PISOSCHI; POP, 2015; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

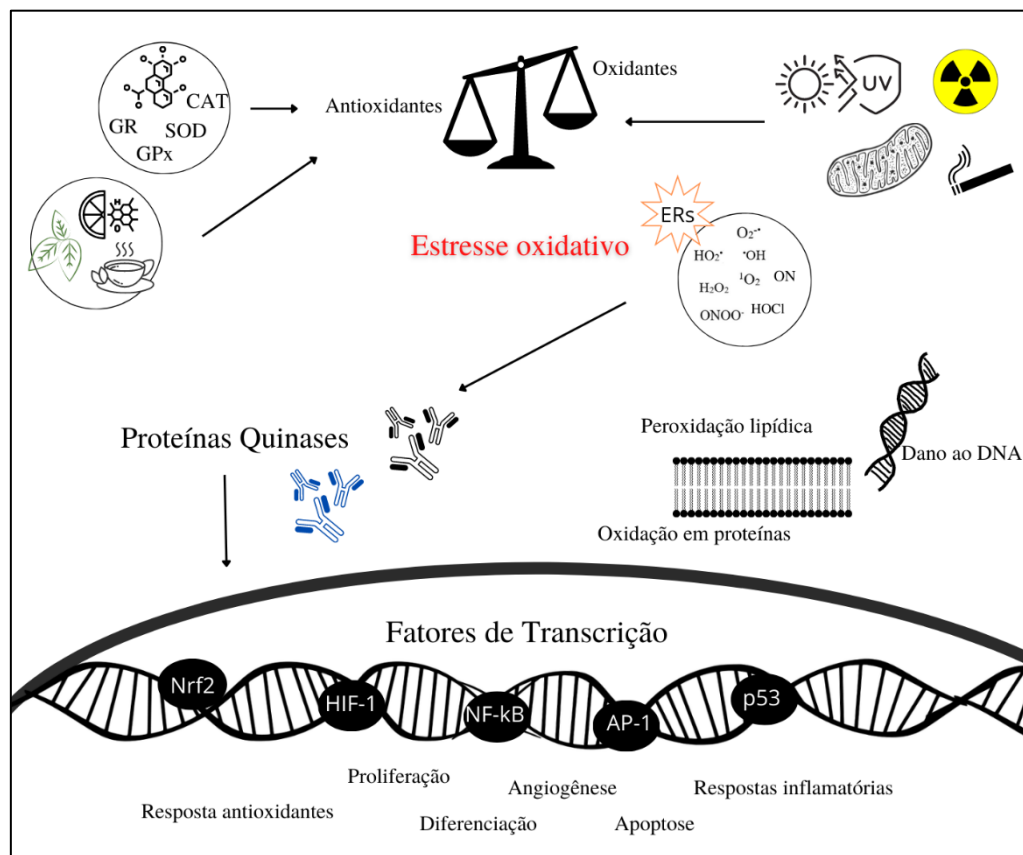
O dano celular resulta, sobretudo, do ataque das ERs ao DNA, alterando bases nitrogenadas, rompendo cadeias e induzindo aberrações cromossômicas. Além disso, são capazes de inativar enzimas, causarem oxidação de proteínas, alterar as cadeias laterais e fragmentar a estrutura que irá resultar em perda da atividade celular. Outro foco de atuação das ERs é a oxidação lipídica das membranas celulares e membranas das organelas intracelulares, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo, com potencial prejudicial, alterando a estrutura e resultando na desestabilização da morfologia celular (BUTNARIU, 2012; PISOSCHI; POP, 2015).

Como primeira barreira de atuação antioxidante, o organismo humano desenvolveu importantes enzimas que previnem a formação e promovem a neutralização das ERs (CAMPOS *et al.*, 2017). As principais enzimas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR), antioxidantes endógenos que atuam quebrando e removendo os radicais livres e ainda convertem produtos oxidativos perigosos como por exemplo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio na presença de cofatores como ferro ou manganês (NIMSE; PAL, 2015; MENG *et al.*, 2017).

Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos como a glutaciona, vitamina C, vitamina E, polifenóis e carotenoides vegetais funcionam interrompendo as reações em cadeia dos radicais livres (NIMSE; PAL, 2015). Eles podem ser sintetizados no próprio organismo

como é o caso da glutathiona, ou serem obtidos de forma exógena através da dieta (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Figura 3. Figura esquemática demonstrando vias de sinalização induzidas por ERs. O estresse oxidativo ocorre quando há desbalanço redox entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes. As ERs interagem com algumas proteínas quinases que ativam fatores de transcrição por diferentes vias, levando à regulação de diferentes processos como por exemplo proliferação, diferenciação, angiogênese, apoptose.



CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GR: glutathiona redutase; GPx: glutathiona peroxidase; ERs: espécies reativas; $O_2^{\bullet-}$: ânion superóxido; HO_2^{\bullet} : radical hidroperoxila; $\bullet OH$: radical hidroxila; ON: óxido nítrico; 1O_2 : oxigênio singlete; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; ONOO \bullet : peroxinitrito; Nrf2: fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide; HIF-1: fator-1 induzível por hipóxia; NF-kB: fator nuclear-kB; AP-1: proteína-1 ativadora.

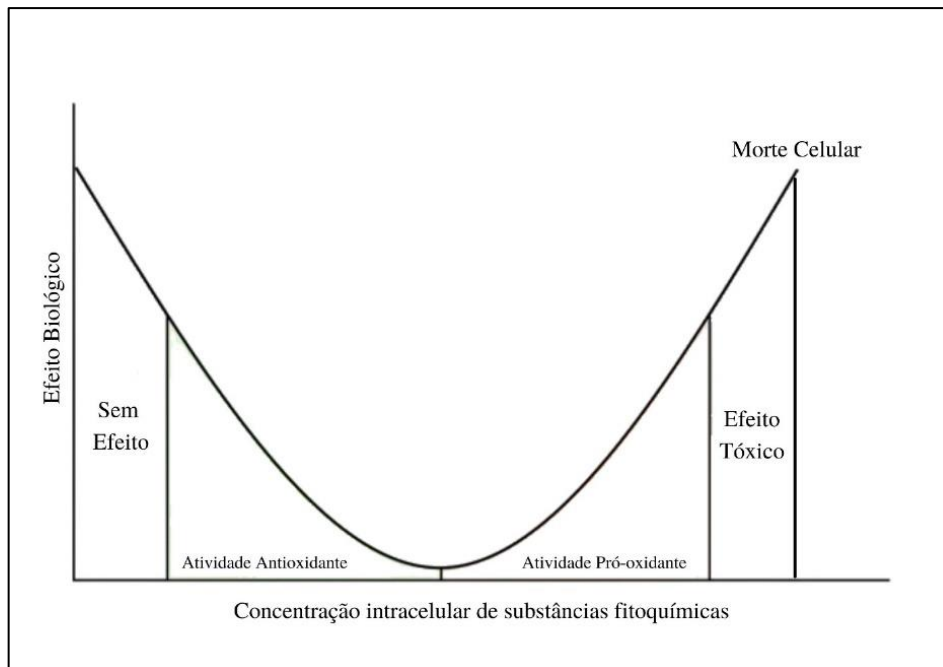
Fonte: autora, adaptado de LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH (2015).

Vários estudos têm demonstrado que substâncias como os polifenóis, claramente melhoram o status de diferentes biomarcadores do estresse oxidativo (ZHANG; TSAO, 2016; CHIKARA *et al.*; 2018). Dessa forma, são caracterizados como potentes antioxidantes obtidos principalmente de vegetais, frutas e chás (CHIKARA *et al.*, 2018) e suas propriedades se devem

principalmente a estrutura química e à capacidade que essas substâncias têm em neutralizar ERs de membranas celulares que possuem ação deletéria. Isso se dá através de diferentes mecanismos de ação: atuam como *scavengers* de ERs, na transferência de átomos de hidrogênio, transferência de elétrons, como quelante de metais de transição ou ainda modulando a atividade e os níveis de expressão de enzimas que estão relacionadas ao estresse oxidativo (CAROCHO; FERREIRA, 2013; PISOSCHI; POP, 2015; VINOITHIYA; ASHOKKUMAR, 2017; GRANATO *et al.*, 2018).

No geral, quando há o desequilíbrio entre antioxidantes e substâncias pró-oxidantes, as ERs interagem com várias proteínas quinases (PI3K, PKC, MAPKs) que levam a ativação de numerosos fatores de transcrição (Nrf2, HIF-1, NF-kB, AP-1, p53). Esses, por sua vez, atuam em diferentes vias, como a regulação da expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose, dependendo do tipo e duração do estímulo (LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015).

Figura 4. Curva demonstrando o efeito hormético de uma substância fitoquímica. Em concentrações mais baixas apresentam atividade antioxidante e pró-oxidante conforme aumenta a concentração.



Fonte: Figura adaptada de FERNANDO; RUPASINGHE; HOSKIN (2019).

Os polifenóis atuam na restauração da homeostase redox, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GR, através da ativação de fatores de transcrição (NrF2) que modulam a expressão dessas enzimas. Outra frente de atuação ocorre através da interferência na cascata de sinalização inflamatória, na qual polifenóis são capazes de reduzir biomarcadores pró-inflamatórios, atenuando ou mesmo suprimindo o estresse oxidativo (ZHANG; TSAO, 2016).

Apesar de serem potentes antioxidantes, fitoquímicos como polifenóis quando perdem um elétron em sua última camada ou quando atuam como agentes redutores sob certas condições, como em altas concentrações, alto pH e na presença de metais de transição tornam-se junto a seus intermediários, pró-oxidantes. Isso faz com que algumas substâncias naturais apresentem efeito bifásico de atuação (figura 4), fenômeno biológico denominado hormese, no qual as moléculas ora atuam como antioxidantes em baixas concentrações, ora atuam como pró-oxidantes em altas doses (FERNANDO; RUPASINGHE; HOSKIN, 2019).

Estudos com polifenóis demonstraram essa atividade pró-oxidativa da molécula (LAMBERT; ELIAS, 2010; SANTOS *et al.*, 2018), sendo indutores de estresse através da oxidação em proteínas celulares, lipídeos de membranas e alterações no DNA, perturbando as funções biológicas nas células (MURAKAMI, *et al.*, 2022). No entanto, a toxicidade potencial dessas substâncias naturais irá depender da dose e do período de exposição.

Apesar de o excesso de ERs estar associado a carcinogênese e a processos relacionados a ela (alterações gênicas, resistência a apoptose, metástase e outros), em alguns casos, essas moléculas pró-oxidantes, acabam por ter um papel benéfico, sendo utilizados como estratégias no tratamento contra o câncer, através do aumento das ERs ou pela diminuição das defesas antioxidantes (LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015).

3.4.2 Ação anticâncer e apoptose

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado das células, levando à formação de tumores malignos, que se distinguem de tumores benignos devido sua capacidade para desdiferenciação, invasividade e capacidade de metastizar (SEYFRIED; SHELTON, 2010; MOURA *et al.*, 2017). Células normais possuem a capacidade de manter o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular, já as cancerígenas apresentam um desequilíbrio no processo, favorecendo divisões descontroladas das células (MISHRA *et al.*, 2018).

Segundo dados recentes, em 2020, foram reportados cerca de 19,3 milhões novos casos e 10,0 milhões de mortes foram em decorrência do câncer (WHO, 2020). Há evidências de que

muitos tipos de câncer são desencadeados por exposição a fatores ambientais como tabaco, produtos químicos, radiação, organismos infecciosos e somente uma proporção muito pequena está relacionada a fatores genéticos, nas quais células normais tornam-se cancerígenas em decorrência de mutações e mudanças fisiológicas nas próprias células (PANTALEÃO; LUCHS, 2010; KAUR *et al.*, 2018).

As células cancerígenas são menos especializadas do que suas células correspondentes normais, de modo que o tecido invadido perde sua função, conforme as células doentes vão substituindo-as. A proliferação descontrolada produz instabilidade genética e as alterações que se acumulam dentro da célula levam a mutações em genes de reparo do DNA (p21, p22, p27, p51 e p53), genes supressores de tumor (p53, NF1, NF2 e RB), oncogenes (MYC, RAF, Bcl-2, RAS) e genes envolvidos no metabolismo do crescimento celular (IQBAL *et al.*, 2017).

O processo de formação de células cancerígenas é dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é um processo rápido, no qual ocorrem modificações em alguns genes induzidos pela exposição das células a carcinógenos e sua interação com o DNA resultando em efeito genotóxicos. Na promoção, os oncopromotores atuam alterando geneticamente as células, tornando-as malignas de forma lenta e gradual. Já na progressão tumoral, há alto nível de instabilidade genética, levando a alterações cromossômicas e multiplicação desordenada das células, aqui, os sinais clínicos já são observados (ALMEIDA *et al.*, 2005; TANAKA, 2013; IQBAL *et al.*, 2019).

As principais formas de tratamento para pessoas diagnosticadas com câncer englobam procedimentos cirúrgicos, radioterapia, imunoterapias e quimioterapia, ou aplicação de mais de uma modalidade concomitantemente dependendo do tipo de câncer, estágio e localização (IQBAL *et al.*, 2017). A quimioterapia é uma abordagem sistêmica e o método padrão de tratamento mais efetivo, entretanto, a maioria dos fármacos são citotóxicos com fortes efeitos adversos por apresentarem baixa seletividade entre células neoplásicas e normais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010; LEZCANO *et al.*, 2018).

O uso de plantas e seus derivados para o tratamento ou quimioprevenção de alguns tipos de câncer possui longa história. São utilizados como agentes terapêuticos e também como adjuvantes de outros quimioterápicos padrões, aumentando a ação benéfica destes e diminuindo seus efeitos indesejados (BRAICU *et al.*, 2020). Normalmente, compostos naturais possuem diferentes alvos na terapia do câncer, incluindo fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatórias, moléculas de adesão e receptores de fatores de crescimento

(SHANMUGAM *et al.*, 2016). Dessa forma, altas taxas de morbidade e mortalidade devido ao câncer vêm motivando interesses científicos na descoberta de novos agentes antitumorais.

Muitos fitoquímicos da dieta têm potencial em inibir processos carcinogênicos interferindo em uma ou várias vias celulares e moleculares, atuando na transdução de sinal, o que inclui a cascata de inflamação, estresse oxidativo, parada do ciclo celular, vias da apoptose e autofagia, supressão no crescimento, proliferação/migração celular, reparo do DNA, inativação/ativação de oncogenes e genes supressores de tumor, desintoxicação por enzimas metabolizantes de xenobióticos, inibição da angiogênese e metástase (TANAKA, 2013; IJAZ *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2019; IQBAL *et al.*, 2019; BRAICU *et al.*, 2020).

Os fármacos antitumorais mais utilizados atualmente são classificados de acordo com seu mecanismo principal de ação e, muitos dos que são utilizados na clínica, são provenientes de fontes naturais. A exemplo, os quimioterápicos vincristina e vimblastina são alcaloides extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, e foram uma das primeiras substâncias a avançar no uso clínico como agentes anticancerígenos. Seu principal mecanismo de ação é atuar em um sítio específico denominado heterodímero da tubulina, inibindo a polimerização de microtúbulos, impedindo a formação do fuso nas células em divisão, resultando em parada durante a metáfase, inviabilizando a mitose em células tumorais (BRANDÃO *et al.*, 2010; KAUR *et al.*, 2011; UNNATI *et al.*, 2013).

Outra substância obtida de fontes naturais, utilizada contra o câncer de ovário, mama e pulmão, é o TaxolTM, extraído a partir da casca da espécie *Taxus brevifolia*, que atua como estabilizador dos microtúbulos, estabilizando-os na forma polimerizada (BHANOT *et al.*, 2011; UNNATI *et al.*, 2013). Algumas substâncias são derivadas de compostos naturais, como no caso do topotecano e o irinotecano, que são semissintetizados a partir da camptotecina extraída do tronco da espécie *Camptotheca acuminata*. Eles atuam ligando-se e inibindo a enzima topoisomerase I (TOPI) que promove a quebra de uma das fitas de DNA, processo essencial durante o ciclo celular (BRANDÃO *et al.*, 2010; LEI *et al.*, 2018).

Um dos principais processos para manter a homeostasia e as funções fisiológicas normais no organismo é a morte celular, que resulta em diferentes respostas biológicas, como na resposta imune e na eliminação de células indesejadas. A apoptose é um tipo de morte celular programada, complexa e que envolve distintas vias, sendo considerada como um obstáculo natural que limita a progressão e o desenvolvimento de células cancerígenas (DUTTA *et al.*,

2019). No entanto, em algumas situações, como em doenças crônicas e no próprio câncer, vias apoptóticas estão desreguladas (TANAKA, 2013).

O processo apoptótico demonstrou ser caspases-dependente, e a resposta é mediada por uma via intrínseca, na qual ocorre mudanças na permeabilidade das membranas mitocondriais, liberação do citocromo C e fatores pró-apoptóticos. As vias extrínsecas, são mediadas por receptores de fatores de necrose tumoral (TNF), que levam à ativação de caspases iniciadoras como caspases-8 e caspases-9, formando e ativando complexos sinalizadores e indutores de morte que promovem a ativação de caspases efetoras como caspase-3 (YAN *et al.*, 2010).

Proteínas da família Bcl-2 também atuam na regulação de processos apoptóticos através da síntese de proteínas pró e anti-apoptóticas (BAX e BAK) e proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) que normalmente estão super expressas em células cancerígenas e levam a quimiorresistência, sobrevivência e progressão da doença (CURTI *et al.*, 2017; BRAICU *et al.*, 2020). Dessa forma, células cancerígenas são capazes de desenvolver diferentes abordagens que evitam a morte celular, tornando-as resistentes à morte programada. Assim, fitoquímicos que atuam em vias seletivas da apoptose em células malignas são alvos fundamentais de estudo, por serem substâncias promissoras para o uso no tratamento do câncer.

Uma estratégia fundamental da ação dos compostos ativos é conceder um ambiente antioxidante nas células para contrabalançar os efeitos letais do estresse oxidativo que está envolvido diretamente com o desenvolvimento de várias doenças, dentre elas o câncer. Os antioxidantes atuam interrompendo reações em cadeia dos radicais livres, convertendo-os em produtos mais estáveis. Dessa forma, antioxidantes podem atrasar ou inibir algumas etapas, como a iniciação ou podem reverter o estágio de promoção inibindo o crescimento ou induzindo apoptose nas células danificadas (TANAKA, 2013).

Por outro lado, a presença de concentrações consideráveis de espécies reativas no ambiente microcelular após a instalação do tumor também induz a morte celular programada através de dois mecanismos principais: geração de ROS ou inibição de sistemas enzimáticos de defesa (WANG; YI, 2008). Esse fato foi observado em alguns estudos, os quais demonstraram que a exposição a baixas concentrações de espécies reativas em um curto período de tempo levou ao crescimento e a promoção celular, no entanto, quando a exposição ocorreu por períodos mais prolongados e em altas concentrações, ocorreu apoptose celular (LI *et al.*, 1997).

3.5 TOXICIDADE

Utilizar plantas, ou substâncias provenientes delas, sempre foi e continua sendo até hoje um dos principais recursos na prevenção e no tratamento das mais diversas doenças, devido ao seu baixo custo, ao fácil acesso, serem culturalmente aceitos e considerados seguros (NEMBO; HESCHELER; NGUEMO, 2020). Porém, grande parte das preparações ou mesmo compostos isolados, podem ser capazes de exercer efeitos nocivos e indesejáveis aos organismos como um todo ou em tecidos e células (KHARCHOUFA *et al.*, 2018).

Um dos pontos essenciais para as possíveis substâncias naturais candidatas a medicamentos é sua segurança e qualidade, e, para isso, vários modelos *in vitro* e *in vivo* são utilizados na averiguação da possível toxicidade dos compostos a curto e longo prazo sob os organismos (CODIGNOTO *et al.*, 2017). Ambos modelos devem ser utilizados, pois um irá complementar o outro: modelos *in vitro*, baseados em células, são preditivos e frequentemente utilizados para triagens iniciais antes da migração para outros modelos; já ensaios *in vivo* possuem um ambiente fisiológico mais completo e complexo levando a resultados mais precisos, no entanto possuem altos custos experimentais e várias questões éticas estão envolvidas (LIU; FINLEY, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) orienta a realização de alguns ensaios *in vitro* como métodos alternativos para o uso de animais, em estudos não clínicos de segurança na busca por novos medicamentos. Assim, metodologias rápidas, de custo relativamente baixo e que reportem alterações nas funções metabólicas ou estruturais das células têm sido amplamente utilizadas antes da migração para ensaios *in vivo*.

Testes de citotoxicidade *in vitro* são capazes de determinar os efeitos tóxicos às células, seja atuando na integridade das membranas ou em suas taxas de crescimento. Além disso, dados obtidos nesses ensaios, como por exemplo a Concentração Inibitória Mínima (IC₅₀), podem ser utilizados para estimar as doses que serão utilizadas em ensaios *in vivo* e dessa forma otimizar estudos que irão envolver animais e humanos (LIMA FILHO *et al.*, 2020). Testes de genotoxicidade *in vitro* permitem identificar substâncias com potencial risco genotóxicos e também são regulamentados por Agências Internacionais como essenciais para o registro de nova drogas (MOURA *et al.*, 2017). A avaliação de substâncias que podem ser genotóxicas, combina uma série de testes que informam três tipos de danos: mutações, alterações cromossômicas estruturais e alterações cromossômicas numéricas (YUZBASIOGLU; ENGUZEL-ALPEREN; UNAL, 2018).

Ensaio de toxicidade *in vivo*, por sua vez, normalmente utilizam animais de laboratório, o que permite determinar possíveis efeitos da ação de substâncias sob os diferentes órgãos e

tecidos e avaliar alterações em parâmetros hematológicos, bioquímicos e anatômicos. Dentre as metodologias utilizadas, uma das mais empregadas é a avaliação da toxicidade aguda e em doses repetidas seguindo protocolos da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

No ensaio da toxicidade aguda, são observados efeitos adversos que podem ocorrer nos animais após a administração oral de uma dose única da substância ou doses múltiplas administrada em 24 horas e, um dos objetivos, é a utilização de um número mínimo de animais. Nesse ensaio, são obtidos dados de mortalidade e a faixa de exposição na qual a letalidade dos animais é esperada, além disso, a substância testada é classificada com base em sua DL₅₀. Os animais após serem tratados são observados individualmente por 14 dias antes da eutanásia programada, para averiguar a presença de sinais de toxicidade como mudanças na pele, olhos e membranas da mucosa; alterações no sistema respiratório, circulatório, autônomo e nervoso central; além de alterações nos padrões comportamentais (OECD, 2001).

O ensaio da toxicidade oral de 28 dias em doses repetidas, acontece após informações sobre toxicidade já terem sido obtidas no ensaio de toxicidade oral aguda. A exposição às substâncias ocorre durante 28 dias e podem ser avaliados efeitos sobre os sistemas nervoso, imunológico e endócrino, além de ações nos sistemas reprodutores feminino e masculino. Para isso, a substância é administrada diariamente, em doses graduadas em vários grupos experimentais e os animais são observados a fim de verificar alterações que indiquem sinais de toxicidade, como por exemplo a ocorrência de secreções e excreções, mudanças na marcha, na postura, presença de movimentos clônicos e tônicos, estereotípias e comportamentos bizarros (OECD, 2008).

Um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado em ensaios de toxicidade, são as mudanças no peso corporal dos animais que podem indicar distúrbios fisiológicos e patológicos significativos (RAINA *et al.*, 2015; MENEGATI *et al.*, 2016). A redução no peso corporal e no peso dos órgãos internos são considerados índices sensíveis de toxicidade após a exposição a substâncias tóxicas, no entanto, pequenas alterações no peso dos órgãos, podem estar relacionados às variabilidades normais dos animais e não a efeitos tóxicos. Conclusões a respeito dessas alterações normalmente são corroboradas com as avaliações dos demais parâmetros. Sinais clínicos mais frequentes de intoxicação aguda associados a alterações do peso são diarreia, anorexia, letargia e alterações em enzimas hepáticas (DEYNO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Avaliações em parâmetros hematológicos determinam alterações fisiológicas no sistema hematopoiético (LI *et al.*, 2010) e os parâmetros bioquímicos trazem informações sobre efeitos tóxicos em tecidos, especialmente rins e fígado (MENEGATI *et al.*, 2016). A biotransformação de substâncias xenobióticas é uma importante função do fígado, portanto, mudanças em enzimas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) podem indicar danos hepatocelulares (MAIMATI *et al.*, 2021). Já alterações em níveis séricos de creatinina (CRE), ureia e outras enzimas, que são marcadores de disfunções renais, podem indicar sérios danos a este tecido afetando vias importantes de degradação e excreção de substâncias indesejáveis ao sistema corporal. Dessa forma, discrepâncias significativas ocasionadas por substâncias naturais nesses marcadores, podem afetar definitivamente funções vitais (BRONADANI *et al.*, 2017; GUEX *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material botânico utilizado nesta pesquisa foi constituído de partes aéreas e raízes de *Richardia brasiliensis*, coletadas no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (S29°43.277'W053°42.844'). Um exemplar da planta foi coletado e identificado pela Prof^a. Dr^a. Thais do Canto-Dorow e o material testemunho foi depositado no herbário SMDB do Departamento de Biologia da UFSM com número de registro 13966. O acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número de registro A2F514D.

O material foi coletado durante o verão, outono, inverno e primavera nos meses de janeiro, abril, agosto e outubro, respectivamente.

Após a coleta, o material foi seco em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 45°C por um período de aproximadamente sete dias, moída em moinho de facas e o pó foi armazenado em frascos âmbar para posterior preparos dos extratos.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Para a realização do *screening* fitoquímico, dois extratos das partes aéreas foram preparados: um extrato hidroetanólico a 20% para pesquisa de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos; e um extrato aquoso a 20% para pesquisa de heterosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogénicos, taninos e amino grupos.

Para os demais ensaios, o extrato bruto de *Richardia brasiliensis* (EBRb) hidroetanólico (70%) das partes aéreas foi obtido por maceração, com renovação do solvente por aproximadamente 30 dias. Após, foi concentrado em rotaevaporador e liofilizado. Os extratos foram denominados conforme a época de suas coletas: (EBV): Extrato bruto de verão; (EBO): Extrato bruto de outono; (EBI): Extrato bruto de inverno; (EBP): Extrato bruto de primavera.

As raízes, foram utilizadas somente no ensaio de UHPLC-ESI-HRFTMS e o extrato bruto foi obtido da mesma forma que o extrato bruto das partes aéreas.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ FITOQUÍMICA

A análise fitoquímica preliminar foi realizada de acordo com Moreira (1979). Na análise, dois extratos foram preparados: um extrato hidroetanólico a 20% para pesquisa de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos; e um extrato aquoso a 20% para pesquisa de heterosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogénicos, taninos e amino grupos. Todas as análises foram realizadas em triplicata com posterior confirmação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

4.4 DOSEAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As dosagens de polifenóis totais foram realizadas de acordo com Chandra e Mejia (2004). Para a determinação, utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu (1 N) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco, no qual foi obtida uma equação para a curva padrão ($y = 0.0386x - 0.0181$ com r de 0.9993), nas concentrações de 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos foram preparados na concentração de 0,04% em água destilada e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu-UV-1201) no comprimento de onda de 730 nm.

Para a dosagem de flavonoides foi utilizado como padrão a quercetina e solução de cloreto de alumínio como reagente. As amostras foram preparadas a 0,04% de extrato seco em metanol 70%. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em miligramas equivalentes de

quercetina por grama de cada extrato. A equação para a curva padrão da quercetina ($y = 0.0127x - 0.0019$ com r de 0.9952), foi obtida nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 25,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$. A leitura foi realizada em 425 nm (RIO, 1996).

A dosagem de taninos foi realizada pelo método da vanilina, conforme Agostini-Costa *et al.* (2003), utilizando como padrão a catequina e a leitura realizada a 490 nm. O conteúdo total de taninos foi expresso em miligramas equivalentes de catequina por grama de cada extrato seco. As concentrações utilizadas para a obtenção da curva padrão ($y = 0.0002x + 0.0024$ com r de 0.9973) foram de 25,0; 150,0; 300,0; 450,0; 600,0; 800,0 e 900 $\mu\text{g/mL}$.

4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM UHPLC-ESI-MS/MS

Uma quantidade de 0,06 g dos quatro extratos liofilizados de *R. brasiliensis* foram ressuspenso em 3 mL de metanol, sonificado até completa dissolução e diluídos em 12 mL de água ultrapura. As amostras foram acidificadas com ácido acético 0,1% (v/v), filtrados em membrana de 0,2 μm e após foram tratados por meio da técnica de extração em fase sólida (SPE). O cartucho utilizado foi Strata C18-E (500 mg, 3 mL, Phenomenex, Torrance, EUA) no qual foi condicionado com 6 mL de metanol:ácido acético 0,2% (1:1, v/v) e equilibrados com 6 mL de ácido acético a 0,1% (v/v). Um volume fixo de 2 mL dos extratos obtidos com uma solução final de metanol:água:ácido acético de 20:80:0,1 (v/v) foi percolado com uma taxa de fluxo de 2 mL/min, seguido por lavagem com 2 mL de ácido acético 0,1%. Por fim, o cartucho foi eluído com 2 mL de metanol.

4.5.1 Determinação de polifenóis por UHPLC-ESI-MS/MS

A partir do método desenvolvido e validado por Faccin *et al.* (2016) foram determinados 24 polifenóis (ácido gálico, ácido clorogênico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, 6-hidroxycumarina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, 4-hidroxycumarina, ácido rosmarínico, quercitrina, mircetina, fisetina, resveratrol, 3-acetilcumarina, ácido trans-cinâmico, quercetina, luteolina, apigenina, canferol, 3,6-diidroxiflavona, crisina e galangina) através de UHPLC-MS/MS com ionização por eletrospray. A análise foi realizada em cromatógrafo Agilente Technologies 1260 Infinity com injeção automática acoplado ao detector de massas Agilent 6430 Triplo Quadrupolo. A coluna cromatográfica utilizada na

separação foi uma coluna Zorbax SB-C18 (Agilent) de dimensões 2.1×50 mm e tamanho de partícula 1,8 µm mantida a temperatura de 40 °C.

Os compostos foram separados utilizando fase móvel com gradiente de eluição que combinou água acidificada com 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila (B) a uma taxa de fluxo constante de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi 5 µL. A fonte de ionização por eletrospray utilizou nitrogênio como gás de secagem na temperatura de 250 °C a um fluxo de 11 L/min, nebulizador com pressão de 30 psi e voltagem capilar de 2,4 kV.

4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR UHPLC-ESI-HRFTMS

Para o ensaio, 1 mg/mL do extrato de raízes e partes aéreas de *R. brasiliensis* foram dissolvidos em metanol (HPLC grau) e filtrados por PTFE (0,22 µm). As amostras foram analisadas por UHPLC-ESI-HRFTMS (Accela-Exactive Plus, Thermo Scientific®), através de coluna analítica ACE® (3,0 × 150 mm, 3 µm), mantida a 40 °C. Como fase móvel, foi utilizado ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B) com o seguinte programa de eluição em gradiente: 10-100% do solvente B em 30 min em gradiente linear, taxa de fluxo de 400 µL/min.

Para a ionização de eletrospray acoplado a espectrometria de massa, foram utilizadas as seguintes condições: tensão de spray = 3,6 kV na ionização em modo positivo, temperatura do capilar de 320 °C e faixa de massa: m/z 120-1500.

Os dados cromatográficos brutos foram extraídos pelo Xcalibur (Thermo Scientific) e posteriormente processado no MZmine 2.10 (MZmine VTT, Finlândia), resultando em um planilha (arquivo .csv) que continha ID, m/z, tempo de retenção, identificação e área de cada pico. Para a identificação dos metabólitos secundários foi utilizado o método de desreplicação, a partir da revisão de compostos relatados para o gênero *Richardia* e família Rubiaceae, utilizando como base de dados o Scifinder e Dicionário de Produtos Naturais (DNP). Os compostos detectados foram desreplicados contra a fórmula molecular e comparadas com a substâncias fitoquímicas previamente relatadas para este gênero ou família botânica.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Ensaio do DPPH

Para o ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), as soluções contendo os extratos foram preparadas em etanol na concentração de 200 µg/mL e diluídas nas concentrações finais de 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL. Como padrão foi utilizado o ácido ascórbico; controle positivo o extrato sem adição de DPPH; e controle negativo o DPPH adicionado de etanol. A leitura procedeu-se em um espectrofotômetro UV/VIS (Kasuki®) no comprimento de onda de 518 nm. A porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação: % de inibição = $100 - [(Abs. Amostra - Abs. Branco) \times 100 / Abs \text{ do controle negativo}]$ e a determinação do IC₅₀ foi obtido por regressão linear, no qual foram utilizados os valores médios das triplicatas (CHOI *et al.*, 2002).

4.7.2 Ensaio da anti-hemólise

Uma suspensão de eritrócitos foi previamente preparada a partir de amostras de sangue coletado de voluntários do grupo de pesquisa, obtidos por punção venosa, separado por centrifugação e lavados sucessivamente com solução tampão PBS pH 7,4.

Para o ensaio da anti-hemólise foi utilizado como controle negativo (0% de hemólise) a suspensão de eritrócitos e tampão PBS, controle positivo (100% de hemólise) suspensão de eritrócitos e água destilada, controle do efeito hemolítico do AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato) suspensão de eritrócitos, tampão e o AAPH 100 mM.

Os EBRb foram avaliados em triplicata, nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL. A leitura espectrofotométrica foi realizada no comprimento de onda de 540 nm e a determinação do IC₅₀ foi calculada em relação à porcentagem de hemólise provocada pelo AAPH na ausência do produto antioxidante (BACCARIN *et al.*, 2015).

4.7.3 Ensaio ORAC

O método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) foi realizado conforme descrito por Ou, Hampsch-Woodill, Prior (2001) no qual avaliou a capacidade das amostras em sequestrar radicais livres contra um radical peroxila, induzido por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C. Para a análise, foi utilizado um leitor de microplacas SpectraMax® M5 (Molecular Devices, California, EUA). A capacidade antioxidante foi determinada usando a área sob curva (AUC) e os resultados foram comparados com uma curva de Trolox (0-96 µmol/L) e expresso em µmol de Trolox/g de extrato bruto. A

AUC foi dada pela seguinte fórmula: $AUC = 1 + \frac{\text{fluorescência em tempo um}}{\text{fluorescência em tempo zero}} + \frac{\text{fluorescência em tempo dois}}{\text{fluorescência em tempo zero}} + \frac{\text{fluorescência em tempo três}}{\text{fluorescência em tempo zero}} + \frac{\text{fluorescência em um ciclo de leitura (1 min)}}{\text{fluorescência em tempo zero}}$.

4.8 PREPARO DAS CULTURAS CELULARES

4.8.1 Coleta de sangue e preparo da cultura de Leucócitos

Para o preparo da cultura celular de leucócitos, foi obtido sangue periférico através de punção venosa, utilizando tubos do tipo Vacutainer® com heparina. As culturas foram preparadas de acordo com metodologias de Montagner *et al.* (2010) e Boligon *et al.* (2012).

Os quatro extratos bruto (EBV, EBP, EBI, EBO) de *R. brasiliensis* foram utilizados nas concentrações de 10; 100 e 500 µg/mL. Em todos os ensaios, as células permaneceram expostas aos tratamentos durante 24 h nas concentrações determinadas e as suspensões celulares foram mantidas a 37 °C e uma atmosfera de 5% de CO₂ durante 24h. Como controle negativo foi utilizado tampão PBS pH 7,4 e controle positivo o peróxido de hidrogênio 100 µM.

A cultura de leucócitos, foi utilizada nos ensaios que avaliaram os parâmetros oxidativos, citotóxicos e genotóxicos, descritos no Artigo I. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Seres Humanos (CAAE: 31211214.4.0000.5306) da Universidade Franciscana, Santa Maria, RS.

4.8.2 Obtenção de PBMCs

Para os ensaios de toxicidade *in vitro*, foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMC), obtidas de amostras de sangue de adultos saudáveis do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana (LEAC-UFN). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos (CAAE:31211214.4.0000.5306) da Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

As PBMCs foram separadas do sangue total por diferença de densidade usando o reagente Ficoll Histopaque-1077. Posteriormente, foram cultivados de acordo com Montagner *et al.* (2010).

Os EBRb foram avaliados nas concentrações de 500, 100, 10, 1 e 0,1 µg/ml. Em todos os ensaios, as células permaneceram expostas aos tratamentos por 24 h nas concentrações determinadas, e as suspensões celulares foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Como controle negativo, foi utilizado o tampão PBS pH 7,4 e controle positivo, o peróxido de hidrogênio 100 µM.

As PBMCs foram utilizadas nos ensaios que avaliaram a toxicidade *in vitro*, descrita no Artigo II. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata.

4.9 PARÂMETROS OXIDATIVOS

Para avaliar parâmetros de oxidação, foram utilizados o ensaio de espécies reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) que estimou a peroxidação lipídica (LPO) através da quantificação do malondialdeído (MDA) um dos produtos finais da LPO. O ensaio foi realizado de acordo com o descrito por Ohkawa *et al.* (1979), no qual a reação produz um composto colorido e pode ser detectado no comprimento de onda de 532 nm. Os níveis de TBARS foram medidos usando uma curva padrão de MDA e os valores expressos em nMol MDA/mL de leucócitos.

Para avaliar a produção do óxido nítrico (ON), as células foram colocadas em contato com o reagente de Griess (ácido fosfórico a 5%, sulfanilamida 1% e N-1-nafiletilenodiaminobicloridrato 0,1%) por 15 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 540 nm (CHOI *et al.*, 2012).

Os radicais livres totais foram quantificados pelo método espectrofluorimétrico da 2'-7'-Diclorofluoresceína Diacetato (DCFH-DA) que tem como base a conversão de um produto não fluorescente, a diclorodihidrofluoresceína (DCFH) em diclorofluoresceína (DCF) através de espécies reativas, em um produto fluorescente.

Após a adição dos EBRb, o sobrenadante foi tratado com o DCFH (10 µM) em placa de 96 poços preta e incubado a temperatura ambiente, no escuro durante 60 min. A leitura se deu em espectrofluorímetro, nos comprimentos de onda de emissão de 525 nm e excitação de 488 nm (BASS *et al.*, 1983; ESPOSTI, 2002; BARRY; MATTHEW, 2004).

4.10 PARÂMETROS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT (Brometo de tetrazolio 2,5-Diphenyl-3, -(4,5-dimethyl-2-thiazolyl), no qual o sal tetrazolium hidrossolúvel, de coloração amarela é incorporado por células viáveis. Após reduzido, o MTT permanece armazenado no citoplasma celular, na forma de um composto formazan de coloração roxo-azulado que pode ser quantificado colorimetricamente, no comprimento de onda de 560 nm, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células viáveis (FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada com base nos valores de fluorescência das amostras comparada ao controle negativo, conforme a equação: $\text{Fluorescência \%} = (\text{fluorescência} * 100) / \text{média do controle negativo}$.

O ensaio do PicoGreen[®] foi utilizado para quantificar o conteúdo de duplas fitas de DNA em solução, após o contato dos EBRb com as células. Para este ensaio, foi adicionado 10 µL do reagente ao homogeneizado contendo o extrato. Após o período de incubação no escuro a temperatura ambiente, ocorreu a leitura em fluorímetro, nos comprimentos de onda de excitação de 480 nm e 520 nm de emissão (HÁ *et al.*, 2011).

Para identificar possíveis danos ao DNA, foi utilizado o ensaio do cometa alcalino (SINGH, 1995) que, através de eletroforese, foi possível detectar presença de quebras de fita única na molécula do DNA e determinar o índice de dano (ID) causados pelos extratos avaliados.

Depois de incubado, o homogenizado, contendo os extratos e os leucócitos, foi disposto em lâminas pré revistas com agarose 1,5%. As lâminas passaram por processo de lise celular, no qual ocorreu a remoção das membras e citoplasma e o núcleo permaneceu exposto para a realização da eletroforese (aproximadamente 20 min, 25 V e 300 mA). Após a corrida eletroforética, as lâminas passaram pelos processos de neutralização, fixação e coloração para posteriormente serem analisadas em microscopia.

O Dano ao DNA foi dado como índice de dano (ID), calculado a partir de células em diferentes classes, variando de zero (nenhum dano) a 4 (dano máximo). A soma dos valores forneceu o índice de dano para cada tratamento. O índice oscilou entre 0 (100 células x 0) e 400 (100 células x 4).

4.11 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

4.11.1 Cultura e tratamento celular

A atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliada em linhagens tumorais de diferentes origens, como melanoma humano (A375), câncer epitelial do colo do útero (HeLa), câncer de mama (MCF-7), câncer colorretal (HT-29) e câncer glioblastoma (U87). Uma linhagem não tumoral de fibroblastos murinos (3T3) também foi usada.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (4,5 g/L de glicose) suplementado por 10% (v/v) de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina a 37 °C, com 5% CO₂. As células foram cultivadas frascos (75 cm²) e tripsinizadas usando tripsina-EDTA quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência (NOGUEIRA *et al.*, 2013).

Para os tratamentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços e o EBRb foi adicionado nas concentrações de 75, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL e incubado por 24 h. Como controle negativo, foi usado um meio DMEM + 5% FBS.

4.11.2 Viabilidade Celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método MTT (MOSMANN, 1983). As linhagens celulares foram incubadas com EBRb por 24 h, e o reagente MTT foi adicionado na concentração de 0,5 mg/mL e incubado por 3 h a 37 °C com 5% de CO₂. Após a remoção do corante, foi adicionado DMSO e as placas foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente com agitação suave, e a absorbância das soluções resultantes foi lida a 550 nm.

A viabilidade celular foi calculada como porcentagem de redução de sal de tetrazólio por célula viável em cada amostra em relação ao controle de células não tratadas. A IC₅₀ (concentração que causa 50% de morte da população de células) foi calculada para cada linhagem por ajuste de curva de porcentagem de sobrevivência celular contra concentrações de extrato.

Por fim, o grau de seletividade do extrato contra linhagens de células tumorais foi determinado e expresso pelo Índice de Seletividade (SI) (BADISA *et al.*, 2006; NOGUEIRA-LIBRELOTTO *et al.*, 2016), utilizando a seguinte fórmula: Índice de seletividade (SI) = IC₅₀ da linhagem celular não tumoral/IC₅₀ da linha celular tumoral.

A linhagem celular de melanoma humano A375 foi novamente submetida ao ensaio MTT como descrito acima e, permaneceu em contato com o EBRb por um período de 72 h.

4.11.3 Apoptose

A linhagem celular de melanoma humano A375 também foi utilizada como modelo *in vitro* para investigar os mecanismos adjacentes de apoptose, com sensibilidade ao EBRb. Para tanto, as células foram cultivadas conforme descrito por Nogueira *et al.* (2013) e incubados por 24 h com o extrato nas concentrações finais de 75, 125 e 250 µg/mL. Na detecção da apoptose, foi utilizado um kit comercial de Anexina PE/7-AAD, e sua aplicação seguiu as instruções do fabricante.

4.12 TOXICIDADE *IN VITRO*

Para avaliar a toxicidade *in vitro*, foram utilizados os ensaios de viabilidade celular pelo MTT, determinação de radicais livres totais utilizando a DCFH-DA, determinação dos níveis de óxido nítrico e a quantificação de DNA pelo método PicoGreen® como descrito anteriormente (BASS *et al.*, 1983; ESPOSTI, 2002; BARRY; MATTHEW, 2004; FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010; HÁ *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2012).

4.13 TOXICIDADE *IN VIVO*

4.13.1 Animais experimentais

Para os ensaios de toxicidade *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar fêmeas e machos (com peso de 80-150 g), obtidos no Biotério Central da UFSM. Os animais foram separados aleatoriamente por sexo, colocados em caixas de polipropileno e aclimatados por uma semana antes do início dos tratamentos. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12:12h, e alimentação e água *ad libitum*.

Os testes foram realizados seguindo os princípios éticos de experimentação animal determinados Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Para desenvolver o protocolo experimental, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o número 4738280618.

4.13.2 Toxicidade aguda

A toxicidade oral aguda do EBRb foi determinada seguindo Diretrizes (OECD423) da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2001).

Foram utilizadas ratas Wistar, nulíparas e não gestantes, divididas em grupos teste e controle (n = 6). Antes de iniciar o tratamento, os animais foram pesados e permaneceram em jejum por 6 h. O EBRb foi administrado em dose única de 2000 mg/kg nos animais testes e o grupo controle recebeu água destilada (2 mL/kg), ambos via oral (gavagem). Após a administração, os animais foram observados individualmente durante os primeiros 30 minutos e posteriormente durante os 14 dias do experimento, monitorando-se peso, consumo de ração, alterações físicas e comportamentais.

No 15º dia, os animais foram anestesiados para eutanásia, o sangue foi coletado por punção cardíaca para análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. O peso relativo dos órgãos de cada animal foi determinado de acordo com a equação: peso relativo = peso absoluto do órgão (g) / peso corporal (g) X 100.

4.13.3 Toxicidade em doses repetidas

Para os ensaios em dose repetida, foram utilizados 20 ratos Wistar fêmeas e 20 machos, seguindo a Diretriz 407 da OECD (OECD, 2008). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: três grupos testes e um grupo controle (n = 5 por grupo/sexo). O EBRb foi administrado nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg de peso corporal e ao grupo controle foi administrada água destilada (3 mL/kg); os tratamentos foram via oral e diários durante 28 dias.

Os animais foram observados individualmente, o peso foi constantemente monitorado, bem como o consumo de ração, mudanças físicas e comportamentais. No 29º dia, os animais foram eutanasiados e os procedimentos foram realizados conforme descrito para o teste de toxicidade oral aguda. Os órgãos vitais, como fígado, rins e baço foram excisados, pesados e armazenados para a realização de ensaios que dosaram dano oxidativo.

4.13.4 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

A coleta de amostras de sangue foi realizada por punção cardíaca com o animal anestesiado (pentobarbital sódico e cloridrato de lidocaína), em frascos estéreis com e sem anticoagulante. O material biológico foi adequadamente homogeneizado e em seguida encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LacVet) da UFSM para ser processado. O soro foi separado da porção sanguínea e mantido congelado para posterior análise.

O sangue coletado em tubos contendo EDTA foi utilizado para as análises hematológicas, as quais incluíram hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), hemácias totais (RBC), volume médio corpuscular (MVC), concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM), plaquetas (PLT) e leucócitos totais (BC-2800 Vet – Auto Hematology Analyzer, Mindray), de acordo com métodos descritos por Schalm (1970).

O leucócito diferencial foi realizado sob microscopia de imersão, com aumento de 1000x, usando esfregaços feitos em lâmina de vidro e corados com Diff-Quick (Laborclin). As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram verificados por refratômetro, usando a porção plasmática do microhematócrito capilar.

A fração sanguínea sem anticoagulante foi centrifugada para obtenção do soro, utilizado na determinação dos níveis de atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina (CRE), fosfatase alcalina (ALP), colesterol total (CHOL), ureia, proteínas séricas totais (T.P.), triglicérides (T.G.), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e gama-glutamil transferase (GGT). Para estas análises, foram utilizados kits comerciais (Bioclin®) e um analisador bioquímico automatizado (Mindray® BC 120).

4.13.5 Parâmetros oxidativos

4.13.5.1 Proteínas carboniladas e peroxidação lipídica

Para a avaliação de dano em proteínas, as proteínas carboniladas foram estimadas no fígado e rins dos animais (REZNICK; PACKER, 1994). Após a reação com o DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina), as amostras foram lidas a 370 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A peroxidação lipídica (LPO), foi estimada pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS). As leituras foram no comprimento de onda de 532 nm seguindo Draper e Hodley (1990). Ambos ensaios, foram realizados em triplicata.

4.13.5.2 Atividade enzimática

Os níveis de atividade das enzimas catalases (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram avaliadas no fígado e rins dos animais. O teste CAT foi realizado de acordo com o método descrito por Aebi (1984). Para determinar a atividade de SOD, o método descrito por Sun e

Zigman (1978) foi utilizado com algumas modificações, e as leituras foram realizadas em tempos diferentes em 480 nm.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados usando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido por teste post-hoc de Tukey (GraphPad Prism Software, Inc., versão 6). Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão (D.P.) e as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta Tese estão apresentados na forma de artigos e suas formatações seguem orientações dos periódicos aos quais foram submetidos.

5.1 ARTIGO I: Publicado no periódico *Natural Product Research*

**Phytochemical characterization, antioxidant capacity, and *in vitro* toxicity
of *Richardia brasiliensis* Gomes crude extracts**

Rafaela Castro Dornelles^{a*}, Camille Gaube Guexa, Ritiel Corrêa da Cruz^b, Rachel de Lima^c, Daniele Rubert Nogueira-Librelo^b, Gustavo de Andrade Ugalde^d, Henrique Faccin^e, Alencar Kolinski Machado^f, Michel Mansur Machado^g, Carine Viana Silva^c, Melânia Palermo Manfron^{b,c}, Liliane de Freitas Bauermann^{a,c}

^aPostgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ^bDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ^cPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ^dDepartment of Crop Protection, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ^eDepartment of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ^fFranciscan University, Santa Maria, RS, Brazil. ^gClinical Immunogenetics Laboratory, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil.

*** Corresponding author**

Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria

Santa Maria, RS, Brazil

Avenue Roraima, 1000, building 21, 97105-900.

E-mail address: rafacdornelles@gmail.com

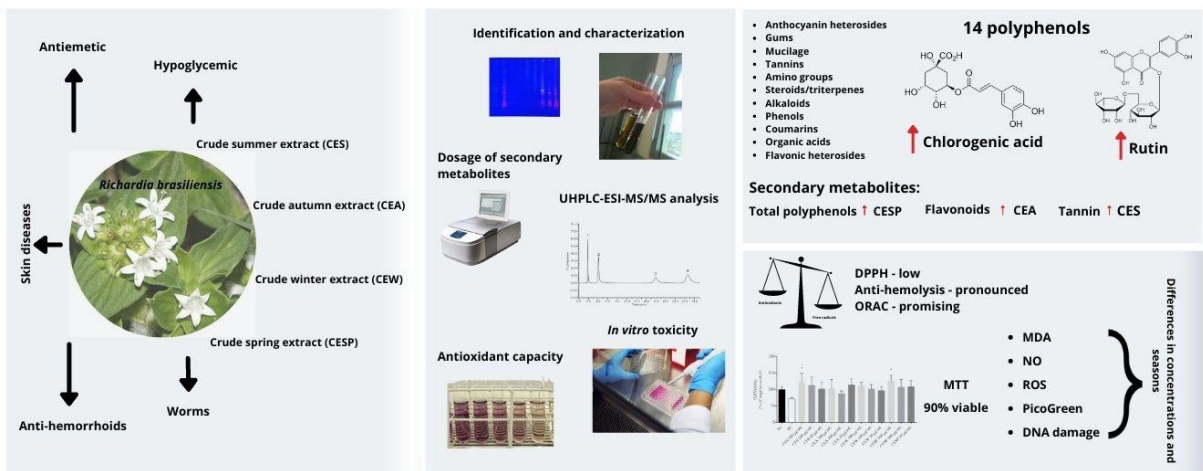
Phone: +55 (55) 981499374

ORCID: 0000-0002-7638-4026

Abstract

Richardia brasiliensis is a species used in folk medicine and rich in active compounds. In this study, the extracts were submitted to UHPLC-ESI-MS/MS analysis and total polyphenols, tannins, and flavonoids assays. Besides, it was determined its antioxidant capacity, oxidative stress markers and toxicological profile. Fourteen polyphenols were found and, in the dosages, a slight change in the concentrations in each extract was observed. Regarding the antioxidant capacity, the responses were different in the methods used. There was an increase in lipid peroxidation, and NO, however total ROS remained unchanged. The cells remained more than 90% viable and the extracts did not cause damage to single strands of DNA, with the exception of the crude autumn and spring extracts at 500 µg/mL. The results found in this study suggest that extracts are potentially toxic to human leukocyte cells in high concentrations; however, more studies should be performed in different cell lines.

Keywords: *Richardia brasiliensis*; Rubiaceae; *poaia branca*; phytochemical profile; biological activity; polyphenols.



1. Introduction

Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae) is an herb popularly known as "poaia branca," is found mainly in the Southern and Midwestern regions of Brazil (Lorenzi, 2008). There are reports of its use in traditional medicine as an antiemetic, hypoglycemic, anti-hemorrhoids, and in the treatment against worms and skin diseases (Figueiredo *et al.* 2009).

In its chemical matrix, there are secondary metabolites such as polyphenols, alkaloids, steroids, triterpenes, organic acids (Morais *et al.* 2013); however, little is known about biological activities and the pharmacological mechanisms.

Traditionally, medicinal plants have been used to treat and cure human diseases, but they are also a source for synthesizing drugs in current clinical use. In this context, the aims of this study were to characterize the phytochemical matrix in plant material, to identify and quantify polyphenolic substances in the extracts of *R. brasiliensis*, as well as to determine the *in vitro* antioxidant capacity, and the cytotoxic and genotoxic effects of the four crude extracts obtained in the different seasons of the year.

2. Results and Discussion

In the aqueous extract (A.E.), anthocyanin heterosides, gums, mucilage, tannins, and amino groups were identified. In the hydroethanolic extract (H.E.), steroids or triterpenes, alkaloids, phenols, coumarins, organic acids, and flavonic heterosides were found.

In the measurements of secondary metabolites (table S1), the highest content of total polyphenols was found in the spring, differing significantly from the other seasons. For flavonoids, the highest concentration was in autumn, but without significantly differing from the levels found in winter and spring. As for tannins, the highest content was in the summer, differing from other seasons. Through UHPLC-ESI-MS/MS, fourteen polyphenols were identified in the *R. brasiliensis* crude extracts. The predominant phenolic compounds were chlorogenic acid and rutin (table S2).

Several studies have demonstrated these differences in the biochemical constitution of extracts, relating such changes mainly to environmental variables to which the plant is subject, extraction methods, plant organ or tissue used, solubility, and type of solvent used to extract the compounds (Hayat *et al.* 2020).

Through the DPPH method, the extracts showed low antioxidant capacity when observed about the ascorbic acid standard. In the anti-hemolysis assay (AAPH), although not significantly different from the standard, the four C.E. had a pronounced antioxidant capacity highlighted on the CES and the CESP (table S3). The C.E. showed promising antioxidant activity obtained through in the ORAC analysis (figure S1). These results demonstrate that the antioxidant capacity is also related to the environmental conditions to which the plant is subjected. In addition, the amount and position of the hydroxyl groups, the molecular weight, the particle size, the solvent concentration, the contact time of the plant material/solvent, the temperature and the mass/solvent ratio also influence their ability to act as an antioxidant agent (Farag *et al.* 2020).

In the TBARS analysis, the extracts increased malondialdehyde (MDA) levels at 500 µg/mL, being statistically similar to the positive control H₂O₂ (100 µM), causing increased lipid peroxidation in the tested cells (figure S2). In the Nitric Oxide assay, it was observed that there was a slight increase in NO at concentrations of 500 µg/mL, except CES. However, there is no significant difference to N.C. (figure S3). In the assay evaluating reactive oxygen species, in general, the extracts maintained low ROS levels in all extracts, although showing some statistically different alterations from both controls (figure S4).

Despite their antioxidant capacity, bioactive compounds such as polyphenols can become highly reactive molecules, increasing oxidative stress since some natural substances have a biphasic action effect, being an antioxidant at low concentrations and pro-oxidant when in higher doses (Chikara *et al.* 2018; Zhang and Tsao, 2016). In the evaluation of lipid peroxidation, our extracts seemed to be damage inducers when used at a higher concentration, increasing MDA levels in leukocyte membranes, which may culminate in important pathogenic events, since changes in polyunsaturated chains alter fluidity and compromise membrane integrity, resulting in cell damage and loss of function (Alché, 2019). It was also possible to observe that both ROS and NO levels slightly increase when evaluated at the highest concentration. Since they are regulatory molecules for many essential physiological functions, these changes and the excess of reactive species can often cause harmful effects on living cells, besides being associated with the development of various types of carcinomas, diabetes, aging, and inflammatory conditions (Fan *et al.* 2020).

In vitro genotoxicity and cytotoxicity assays were used as biological markers to determine possible mutagenic and genotoxic effects of the plant under study. In cell viability, the extracts could maintain cells at more than 90% viable (figure S5), and this critical parameter

was a prerequisite for the development of other cytotoxicity assays (Carvalho *et al.* 2015). In the assay that detected the presence of double-stranded DNA exposed to the medium, an increase in the presence of free dsDNA in the solution was observed (figure S6).

In the alkaline comet assay, the extracts presented a dose-dependent behavior in which the concentrations of 500 $\mu\text{g/mL}$ slightly increased the damage, decreasing as the tested concentration decreases (figure S7). However, only CEW (500 $\mu\text{g/mL}$) showed a significant difference. Compared to P.C. (39 D.I.), all seasons and concentrations evaluated presented a low damage index (D.I.). At the 500 $\mu\text{g/mL}$ concentration, the damage indices for CES, CEA, CEW, and CESP were 9, 10, 13, and 8 D.I., respectively. In the same extracts, but at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, the D.I.s were 9, 7, 7, 7, and at the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$, they were 7, 4, 4, 7, respectively.

4. Conclusion

In summary, the chemical characterization of *R. brasiliensis* extracts determined the presence of flavonoids, alkaloids, coumarins, organic acids, among others. Fourteen polyphenols were identified that differed in their concentrations in the different extracts, showing high concentrations of rutin and chlorogenic acid. In the dosages of total polyphenols, flavonoids, and tannins, variations were also observed in different seasons, confirming that environmental changes (temperature, humidity, precipitation, etc.) directly influenced the chemical constitution of the plant under study. Regarding the antioxidant capacity, the DPPH assay showed low activity; however, our results were entirely satisfactory in the anti-hemolysis and ORAC assay, demonstrating that the species has an excellent capacity to protect against oxidative damage. The *in vitro* assays showed that the extract was able to induce oxidation levels depending on the concentrations tested, besides the present specific cytotoxic potential for human leukocytes at the highest tested concentration. Our findings were an essential step towards a better phytochemical and biological knowledge of the species. Despite the varied phytochemical composition, emphasizing polyphenols' presence, of polyphenols, in general, *R. brasiliensis* seems to have a certain degree of toxicity *in vitro*. However, the mode of action of the extract is still unclear, and further studies of toxicological characterization are needed.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Fundin

None.

Acknowledgments

The authors thank UFSM, Franciscan University, and the Federal University of Pampa for the availability of material and human resources in developing the research. We also thank for the availability of Prof. Dr. Thais Scott do Canto-Dorow for identifying the species.

References

- Alché, J. D. 2019. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox Biolo* 23, 101136. doi:10.1016/j.redox.2019.101136.
- Carvalho, A. V.; Lubeck, I.; Rocha, M. B.; Guez, C. M.; Machado, M. M.; Oliveira, L. F. S. O. 2015. Evaluation of the tickcide, genotoxic, and mutagenic effects of the *Ruta graveolens* L. (Rutaceae). *Acta Sci* 37, 491-497. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i4.27576>.
- Chikara, S.; Nagaprashantha, D. L.; Singhal, J.; Horne, D.; Awasthi, S.; Singhal, S. S. 2018. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett* 413, 122-134. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.002.
- Fan, Z.; Wang, Y.; Yang, M.; Cao, J.; Khan, A.; Cheng, G. 2020. UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities. *Food Chem* 318, 126512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126512>.
- Farag, R. S.; Abdel-Latif, M. S.; Baky, H. H. A.; Tawfeek, L. S. 2020. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnol Rep* 28, e00536. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00536>.
- Figueiredo, A. D. L.; Bustamante, K. G. L.; Soares, M. L.; Pimenta, F. C.; Bara, M. T. F.; Fiuza, T. S.; Tresvenzol, L. M. F.; Paula, J. R. 2009. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). *Rev. Ciênc. farm. Básica Apl* 30, 193-196.
- Hayat, J.; Akodad M.; Moumen, A.; Baghour, M.; Skalli, A.; Ezrari, S.; Belmalha, S. 2020. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. *Heliyon* 6, e05609. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05609.
- Lorenzi, H., 2008. Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4, 440p.
- Morais, E. C.; Nogueira, L. F. B.; Leite, J. L. A.; Lucena, L. S.; Figueredo, F. G.; Guedes, G. M.; Tintino, S. R.; Souza, C. E.; Braga, M. F.; Lima, M. A.; Souza, F. H. T.; Dias, C. S.; Coutinho, H. D. 2013. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. *Indian J Tradit Know* 12, 619-622.

Zhang, H.; Tsao, R. 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food Sci* 8, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Phytochemical characterization, antioxidant capacity, and *in vitro* toxicity of *Richardia brasiliensis* Gomes crude extracts

3. Experimental

3.1. Botanical material and extract preparation

The species *Richardia brasiliensis* was collected at the Federal University of Santa Maria (UFSM), R.S., Brazil (29°43.277S, 053°42.844W), identified by Dr. Thais Scott do Canto-Dorow, and deposited in the herbarium of the Department of Biology (SMDB) of UFSM, under registration 13966. The access to genetic heritage or associated traditional knowledge is registered in the *Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen) under the number A2F514D.

The pharmacon was composed of the aerial parts (stem, leaves, and flowers), collected in summer (January), autumn (April), winter (August), and spring (October). These parts were oven-dried at 45°C for seven days and reduced to powder in a knife mill. To prepare the crude extracts (C.E.), maceration with hydroethanolic solvent (70%) was used for 30 days after the material obtained was concentrated and lyophilized. The extracts were denominated according to the time of their collections: (CES): Crude summer extract; (CEA): Crude autumn extract; (CEW): Crude winter extract; (CESP): Crude spring extract.

3.2. Identification and characterization of the chemical matrix

Phytochemical screening was performed using colorimetric methods to identify secondary metabolites, following Moreira (1979); Wagner and Bladt (1996); Costa (1982). The analyses prepared a 20% hydroethanolic extract (H.E.) for the alkaloids, flavonoids, coumarins, anthraquinones, steroids, triterpenes, and a 20% aqueous extract (A.E.) for the anthocyanin heterosides, saponins, cyanogenic heterosides, tannins, and amino groups. All analyses were performed in triplicate.

According to Wagner and Bladt (1996), the extracts were subjected to thin-layer chromatography (L.C.) using the stationary phase silica G chromatoplates, with or without fluorescence as the mobile solvent phase or a solvent mixture and a developer when necessary. The extracts were chromatographed along with standards made available for each secondary compound group.

3.3. Dosage of total polyphenols, flavonoids, and tannins

Dosages of total polyphenols were performed under Chandra and Mejia (2004). For the determination, Folin-Ciocalteu reagent (1N) was used, and the results are expressed in milligrams of gallic acid per gram of dry extract, in which an equation for the standard curve ($y = 0.0386x - 0.0181$, with $r = 0.9993$) was obtained for the concentrations of 1; 3; 5; 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$. The extracts were prepared at a concentration of 0.04% in distilled water, and the readings were performed in a spectrophotometer (Shimadzu-UV-1201) at a wavelength of 730 nm.

For flavonoid dosing, a quercetin standard with an aluminum chloride solution (reagent) was used. Samples were prepared using 0.04% dry extract in 70% methanol. Total flavonoid content is expressed in milligrams of quercetin equivalent per gram of each extract. The equation for the standard quercetin curve ($y = 0.0127x - 0.0019$, with $r = 0.9952$), was obtained at the concentrations of 5; 10; 15; 25 and 30 $\mu\text{g/mL}$. Reading was performed at 425 nm (Woisky and Salatino, 1998).

The tannin dosage was performed using the vanillin method, following Agostini-Costa *et al.* (2003), using catechin as the standard with a reading performed at 490 nm. The total tannin content is expressed in milligrams equivalent to catechin for grams of each dry extract. The concentrations used to obtain the standard curve ($y = 0.0002x + 0.0024$, with $r = 0.9973$) were 25; 150; 300; 450; 600; 800 e 900 $\mu\text{g/mL}$.

3.4. Preparation of the samples for analysis by UHPLC-ESI-MS/MS

An amount of 0.06 g of *R. brasiliensis* lyophilized extracts was re-suspended in 3 mL of methanol and sonicated until complete dissolution and then diluted in 12 mL of ultrapure water. The samples were acidified with acetic acid 0.1% (v/v), filtered through a 0.2 μm membran, and afterward treated using the solid phase extraction technique (SPE). The cartridge

used was a Strata C18-E (Phenomenex, Torrance, USA), 500 mg, 3 mL. The samples were conditioned with 6 mL of methanol:acetic acid 0.2% (1:1, v/v) and equilibrated with 6 mL of acetic acid 0.1% (v/v) in water. A fixed volume of 2 mL of extracts, obtained with final methanol: water: acetic acid solution of 20:80:0.1 (v/v), was percolated at a 2 mL/min flow rate, followed by washing with 2 mL of acetic acid 0.1%. Finally, the cartridge was eluted with 2 mL of methanol.

3.5. Determination of polyphenols by UHPLC-ESI-MS/MS

From the method developed and validated by Faccin *et al.* (2017), 24 polyphenols (gallic acid, chlorogenic acid, catechin, vanillic acid, caffeic acid, 6-hydroxycoumarin, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, 4-hydroxycoumarin, rosmarinic acid, quercitrin, myricetin, fisetin, resveratrol, 3-acetylcoumarin, trans-cinnamic acid, quercetin, luteolin, apigenin, kaempferol, 3,6-dihydroxyflavone, chrysin and galangin) were characterized by UHPLC-MS/MS with electrospray ionization. The analysis was performed in an Agilent Technologies 1260 Infinity chromatograph with automatic injection coupled to Agilent 6430 Triple Quadrupole mass spectrometer. The chromatographic column used in the separation was a Zorbax SB-C18 (Agilent) column of dimensions 2.1 × 50 mm and particle size 1.8 µm maintained at a temperature of 40°C.

The compounds were separated using the elution gradient mobile phase, which combined acidified water with acetic acid 0.1% (A), and acetonitrile (B) at a constant flow rate of 0.8 mL/min and injection volume was 5 µL. The elution program was: 8.0% B (0.00-0.10 min); 8.0-25.8% B (0.10-3.45 min); 25.8–54.0% B (3.45-6.90 min); 54.0-100.0% B (6.90-7.00 min); and 100.0% B (7.00-9.00 min).

As a source of electrospray ionization, nitrogen was used as the drying gas at a temperature of 250°C, with an 11 L/min flow, a 30 psi nebulizer, and a 2.4 kV capillary voltage. Afterwards, the ionized compounds were analyzed in an Agilent 6430 Triple Quadrupole mass spectrometer operating in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with a resolution of 0.7 m/z (FWHM). High purity nitrogen gas was used to induce collisions and the collision energy was optimized for each analyte. After finishing the gradient program, a time of 4.0 min was adopted for re-equilibrating the system, which was based on the initial pressure being established and the acquired data were analyzed in specific software (Faccin *et al.* 2016).

3.6. Antioxidant capacity

3.6.1. DPPH radical sequestration assay

For the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay, the solutions containing the extracts were prepared in ethanol at a concentration of 200 µg/mL and diluted to final concentrations of 1.5625; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 and 200 µg/mL. Ascorbic acid was used for the standard, and a positive control used extract without DPPH, and a negative control used DPPH and ethanol. Readings were carried out on a spectrophotometer UV/VIS (Kasuaki®) at 518 nm. The percent inhibition was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(\text{Sample Abs} - \text{White Abs}) \times 100 / \text{negative control Abs}]$$

Determination of IC₅₀ was obtained by linear regression, being the mean values of the triplicates (Choi *et al.* 2002).

3.6.2. AAPH Anti-hemolysis assay

An erythrocyte suspension was previously prepared from blood samples collected from volunteers in the research group, obtained by venipuncture, separated by centrifugation, and washed successively with PBS pH 7.4 buffer solution. For the anti-hemolysis assay, it was used: (a) negative control (erythrocyte suspension + PBS buffer); (b) positive control (erythrocyte suspension + distilled water); (c) hemolytic effect control of AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) (suspension + PBS + 100 mM AAPH.); (d) treatment groups: PBS + suspension + 100 mM AAPH + extracts at the concentrations of 10, 25, 50, 100, 250, and 500 µg/mL. All of the assays were evaluated in triplicate. Spectrophotometric readings were taken at 540 nm and the IC₅₀ (inhibitory concentration 50) was calculated (Baccarin *et al.* 2015).

3.6.3. ORAC Assay

The ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) method was performed as described by Ou *et al.* (2001), in which the ability of the sample to sequester free radicals against a peroxy radical, induced by 2,2'-azobis aminopropane dihydrochloride (AAPH) at 37°C was assessed. For analysis, a SpectraMax® M5 microplate reader (Molecular Devices, California,

USA) was used. The antioxidant capacity was determined from the area under the curve (AUC), and the results were compared with a Trolox curve (0-96 $\mu\text{mol/L}$) and expressed in μmol Trolox/g crude extract. The following formula gave the AUC:

$$\text{AUC} = 1 + \frac{\text{time one fluorescence}}{\text{time zero fluorescence}} + \frac{\text{time two fluorescence}}{\text{time zero fluorescence}} + \frac{\text{time three fluorescence}}{\text{time zero fluorescence}} + \frac{\text{one reading cycle fluorescence (1 min)}}{\text{time zero fluorescence}}$$

3.7. Human Blood Samples and Preparation of Leukocyte Culture

For cell culture preparation, peripheral blood was obtained through venipuncture, using tubes of the type Vacutainer[®] with heparin. Leukocyte cultures were prepared according to methodologies by Montagner *et al.* (2010); Boligon *et al.* (2012).

The four crude extracts (CES, CEA, CEW, CESP) of *R. brasiliensis* were used in concentrations of 10, 100, and 500 $\mu\text{g/mL}$. In all tests, the cells remained exposed to the treatments for 24 h at the determined concentrations, and the cell suspensions were maintained at 37°C and an atmosphere of 5% CO_2 for 24 h. The negative control with a PBS buffer pH 7.4 and positive control with 100 μM hydrogen peroxide was included. All parameters were evaluated in triplicate.

The Ethics Committee approved the project for Human Beings of the Franciscan University, Santa Maria, RS (CAAE: 31211214.4.0000.5306).

3.8. Oxidative parameters

To evaluate oxidation parameters, it was used the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, which estimates lipid peroxidation (LPO) through the quantification of malondialdehyde (MDA), one of the final products of LPO. The test was carried out by Ohkawa *et al.* (1979), and spectrophotometric readings were performed at 532 nm.

To evaluate nitric oxide production (NO), the cells were placed in contact with the Griess reagent (5% phosphoric acid, 1% sulfanilamide, and 0.1% N-1-naphthylethylenediamine-dihydrochloride) for 15 min at room temperature. Absorbance was measured at 540 nm (Choi *et al.* 2012).

Total levels of reactive oxygen species (ROS) were quantified by the 2'-7'-Dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA) spectrofluorimetric method based on the

conversion of a non-fluorescent product, dichlorodihydrofluorescein (DCFH), into dichlorofluorescein (DCF) through reactive species in a fluorescent product. After adding the CERb, the cells were treated with DCFH (10 μ M) and incubated at room temperature in the dark for 60 min. The emission was at 525 nm and the excitation at 488 nm (Bass *et al.* 1983; Esposti, 2002; Barry and Matthew, 2004).

3.9. Cytotoxic and genotoxic parameters

The cellular viability was evaluated using the MTT method (2,5-Diphenyl-3-tetrazolium bromide (4,5-dimethyl-2-thiazolyl), in which the yellow water-soluble tetrazolium salt is incorporated by viable cells. After reduction, the MTT remains stored in the cell cytoplasm, in the form of a formazan compound with a bluish-purple coloration that can be quantified colorimetrically at 560 nm absorbance value proportional to the number of viable cells (Fukui *et al.* 2010). The results are expressed as the percentage cell viability of that of the negative control.

To quantify the content of DNA released in the medium after contact of the C.E. with the cells was used the PicoGreen[®] assay. For this assay, an ultra-sensitive fluorescent reagent was used in which it was possible to quantify the double strand of DNA (dsDNA) in solution by reading the excitation at 480 nm and 520 nm of emission (Há *et al.* 2011). Results were expressed as free extracellular dsDNA levels (% of negative control).

To identify possible DNA damage was used the alkaline comet assay (Singh, 1988). In this assay, through electrophoresis, it is possible to detect the presence of single-strand breaks in the DNA molecule and determine the damage index (D.I.), calculated from cells in different damage classes, ranging from zero (no damage) to 4 (maximum damage). The sum of the values provides the damage index for each treatment. The index ranges from 0 (100 cells x 0) to 400 (100 cells x 4).

3.10. Statistical analysis

The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's posthoc test (GraphPad Prism Software, Inc., version 6). The data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.), and the differences between the groups were considered statistically significant when $p < 0.05$.

References

- Agostini-Costa, T. S.; Lima, A.; Lima, M. V., 2003. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. *Quím Nova* 26, 763-765. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500022>.
- Baccarin, T.; Mitjans, M.; Lemos-Senna, E.; Vinardell, M. P., 2015. Protection against oxidative damage in human erythrocytes and preliminary photosafety assessment of *Punica granatum* seed oil nanoemulsions entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction. *Toxicol in Vitro* 30, 421-428. doi:10.1016/j.tiv.2015.09.020.
- Barry, H.; Matthew, W., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142, 231–255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776.
- Bass, D. A.; Parce, J. W.; Dechatelet, L. R.; Szejda, P.; Seedes, M. C.; Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130, 1910-1917.
- Boligon, A. A.; Sagrillo, M.; Machado, L. F.; Filho, O. S.; Machado, M. M.; da Cruz, I. B. M.; Athayde, M. L., 2012. Protective Effects of Extracts and Flavonoids Isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against Chromosome Damage in Human Lymphocytes Exposed to Hydrogen Peroxide. *Molecules* 17, 5757-5769. <https://doi.org/10.3390/molecules17055757>.
- Chandra, S.; Mejia, E. G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem* 52, 3583-3589. doi:10.1021/jf0352632.
- Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. H.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M. Y.; Park, S. H.; Kim, S. K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161-1168. doi:10.1016/S0168-9452(02)00332-1.
- Choi, W. S.; Shin, P. G.; Lee, J. H.; Kim, G. D., 2012. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol* 280, 164-170. doi:10.1016/j.cellimm.2012.12.007.
- Costa, A. F., 1982. *Farmacognosia*. 2.ed. Fundação Calouste Gulbenkian 1032p.
- Esposti, M. D., 2002. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods*, 26, 335-340 doi: 10.1016/S1046-2023(02)00039-7.
- Faccin, H.; Viana, C.; do Nascimento, P. C.; Bohrer, D.; de Carvalho, L. M. 2016. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chrom A*, 1427, 111–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.017>.
- Faccin, H.; Loose, R. F.; Viana, C.; Lameira, O. A.; Carvalho, L. M., 2017. Determination of phenolic compounds in extracts of Amazonian medicinal plants by liquid chromatography-

electrospray tandem mass spectrometry. *J. Anal Methods Chem* 9, 1141-1151.
<https://doi.org/10.1039/C6AY02937J>.

Fukui, M.; Yamabe, N.; Zhu, B. T., 2010. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Eur J Cancer* 46, 1882–1891.
[doi:10.1016/j.ejca.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.004).

Há, T. T. N.; Huy, N. T.; Murao, L. A.; Lan, N. T. P.; Thuy, T. T.; Tuan, H. M.; Nga, C. T. P.; Tuong, V. V.; Dat, T. V.; Kikuchi, M.; Yasunami, M.; Morita, K.; Huong, V. T. Q.; Hirayama, K., 2011. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One* 6, 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025969>.

Montagner, G. F. F.; Sagrillo, M.; Machado, M. M.; Almeida, R. C.; Mostardeiro, C. P.; Duarte, M. M. F.; da Cruz, I. B. M., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol in Vitro* 24, 1410-1416. [doi: 10.1016/j.tiv.2010.04.010](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.010).

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

Ohkawa, H.; Yagi, N. O., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358. [doi:10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. *J Agric Food Chem* 49, 4619-4629. [doi:10.1021/jf010586o](https://doi.org/10.1021/jf010586o).

Singh, N.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res* 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

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

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

Tables:**Table S1.** Dosing of total polyphenols, flavonoids, and tannins in the four crude extracts of *R. brasiliensis*.

Constituents	Crude extract (mg/g)			
	CES	CEA	CEW	CESP
Total polyphenols	26.37 ^d ± 0.46	28.09 ^b ± 0.07	27.32 ^c ± 0.16	30.67 ^a ± 0.25
Flavonoids	15.73 ^b ± 0.39	28.90 ^a ± 0.73	27.75 ^a ± 0.57	27.50 ^a ± 1.09
Tannins	38.54 ^a ± 0.19	12.45 ^d ± 0.12	15.82 ^c ± 0.66	17.20 ^b ± 0.19

Results are expressed as mean ± S.D. Different letters indicate statistical differences. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. (CES): Crude summer extract; (CEA): Crude autumn extract; (CEW): Crude winter extract; (CESP): Crude spring extract.

Table S2. Compounds identified and quantified by UHPLC-ESI-MS/MS in the four crude extracts of *R. brasiliensis*.

Compounds	Fragmentor (V)	CES (mg/g)	CES			CEA (mg/g)	CEA			CEW (mg/g)	CEW			CESP (mg/g)	CESP		
			a	b	r		a	b	r		a	b	r		a	b	r
Chlorogenic acid	104	0.386 ± 0.0062	3.31	2099.18	0.999	1.5863 ± 0.0179	0.76	1580.19	0.999	0.4475 ± 0.0111	3.50	2367.5	0.995	0.5073 ± 0.0169	3.91	2995.16	0.991
Catechin	134	0.028* ± 0.0012	4.60	226.87	0.998	0.037 ± 0.0015	3.99	206.06	0.998	0.0171 ± 0.0007	4.52	125.66	0.999	0.0288* ± 0.0017	4.27	199.60	0.996
Vanillic acid	92	0.023 ± 0.0010	17.80	368.33	0.999	0.0275 ± 0.0015	15.41	300.40	0.999	0.0377 ± 0.0005	15.08	468.93	0.999	0.0574 ± 0.0012	15.02	712.2	0.999
Caffeic acid	106	0.0054 ± 0.0005	8.61	161.13	0.997	0.0136* ± 0.0006	7.72	288.26	0.998	0.0182 ± 0.0003	8.58	499.46	0.999	0.0142* ± 0.0004	8.29	376.86	0.998
P-coumaric acid	96	0.0034 ± 0.0001	14.42	343.20	0.999	0.0083 ± 0.0004	11.53	530.86	0.998	0.0075 ± 0.0002	12.76	618.86	0.999	0.0104 ± 0.0001	12.30	823.80	0.999
Ferulic acid	88	0.0107 ± 0.001	13.94	251.60	0.998	0.0246 ± 0.0017	11.05	361.60	0.997	0.0223 ± 0.0006	11.62	401.53	0.999	0.0293 ± 0.0002	11.17	506.86	0.999
Rutin	210	0.8938 ± 0.0132	18.42	56458.40	0.999	2.1128 ± 0.0211	7.59	43492.95	0.999	0.502 ± 0.0134	13.53	21423.73	0.995	4.1228 ± 0.0801	2.49	32383.80	0.998
Rosmarinic acid	138	0.0116 ± 0.0013	4.23	91.67	0.997	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quercitrin	164	-	-	-	-	0.0008 ± 0.0001	5.93	89.33	0.999	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-cinnamic acid	90	0.0015* ± 0.0003	38.88	86.60	0.999	0.0038 ± 0.0011	35.55	162.93	0.998	0.0014* ± 0.0001	37.77	74.66	0.999	0.0007* ± 0.0003	36.70	35.13	0.998
Quercetin	126	0.0062* ± 0.0007	32.79	354.67	0.998	0.0074* ± 0.0011	35.05	354	0.998	0.1336 ± 0.0033	28.62	6107.73	0.997	0.1146 ± 0.0045	33.84	6192.26	0.994
Luteolin	162	< ILOQ	8.93	2.27	0.999	< ILOQ	9.95	-10.53	0.994	0.0003 ± 0.0001	8.95	16.60	0.999	0.0008 ± 0.0002	8.92	44.46	0.998
Apigenin	136	0.0002 ± 0.0001	9.30	11.53	0.999	0.0002 ± 0.0001	8.78	9.46	0.999	-	-	-	-	< ILOQ	8.68	-6.13	0.999
Kaempferol	164	0.0043 ± 0.0011	11.94	21.73	0.999	0.0147 ± 0.0027	10.71	52.46	0.999	0.0953 ± 0.0045	10.13	375.86	0.998	0.0661 ± 0.0029	10.51	270.13	0.999

Results are expressed as mean ± S.D. (V): Fragmentor energies. (CES): Crude summer extract. (CEA): Crude autumn extract. (CEW): Crude winter extract. (CESP): Crude spring extract. (ILOQ): Limit of Instrumental Quantification. (a): Slope (µg/g). (b): Intercept (µg/g). (r): Correlation coefficient of the standard addition analytical curve. (*): no significant difference between seasons.

Table S3. Antioxidant capacity of crude extracts of *R. brasiliensis*.

Samples	IC ₅₀ (mg/mL)	
	DPPH	AAPH
Standard	0.0272 ^a ± 0.01	0.2534 ± 0.04
CES	0.2916 ^b ± 0.03	0.5051 ± 0.03
CEA	0.2460 ^b ± 0.01	0.1531 ± 0.02
CEW	0.2040 ^b ± 0.01	0.1566 ± 0.01
CESP	0.1456 ^b ± 0.01	0.3702 ± 0.03

Results are expressed as mean ± S.D. Different letters indicate statistical differences. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. Standard: Ascorbic acid; (CES): Crude summer extract; (CEA): Crude autumn extract; (CEW): Crude winter extract; (CESP): Crude spring extract.

Fig S1 Antioxidant activity of C.E. through the ORAC assay. (CES): Crude summer extract; (CEA): Crude autumn extract; (CEW): Crude winter extract; (CESP): Crude spring extract.

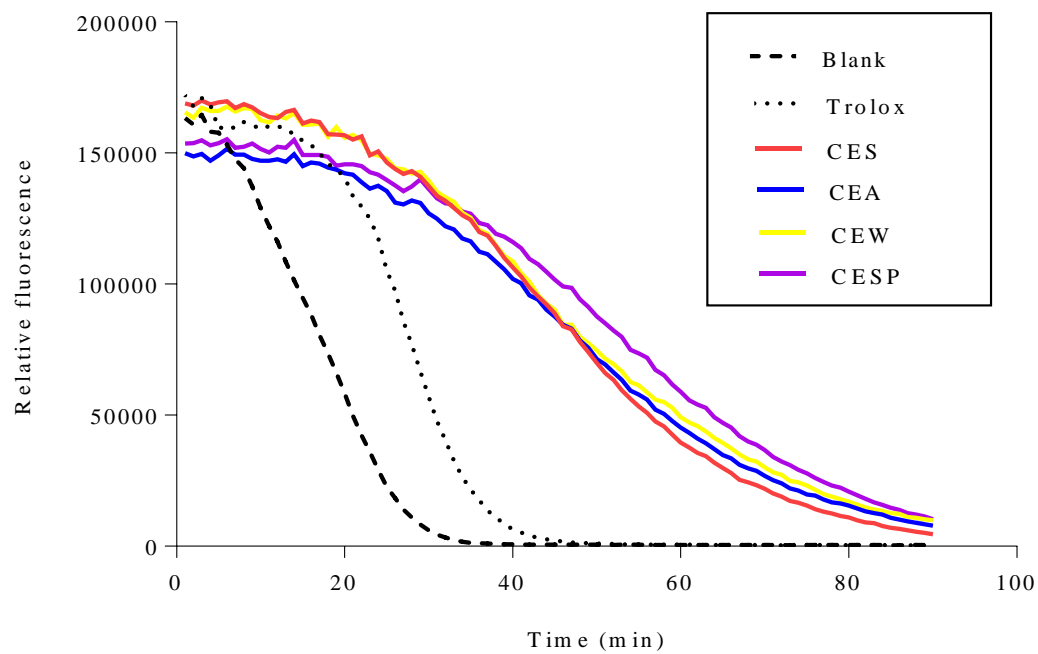
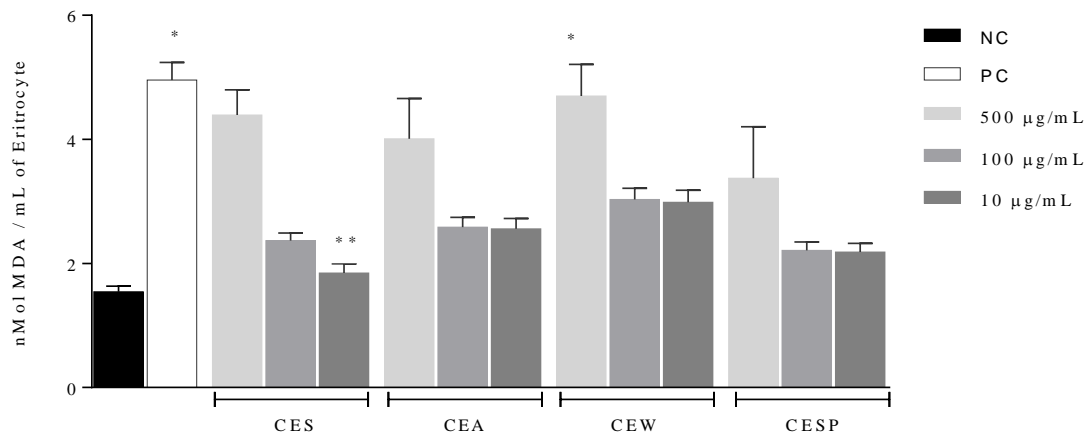
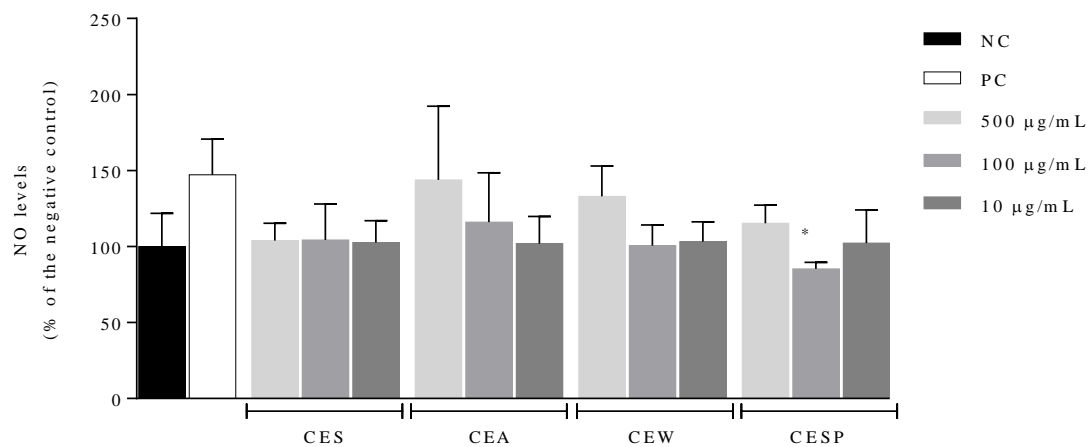


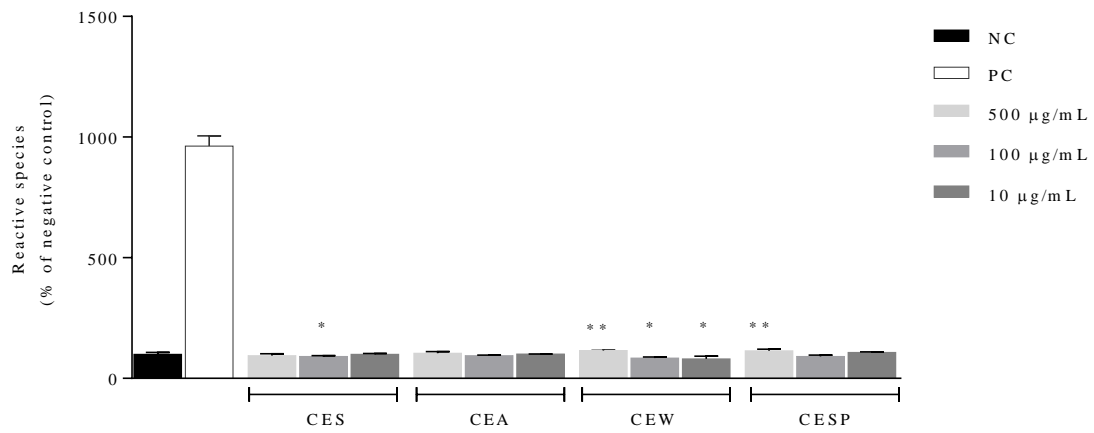
Fig S2 TBARS lipid peroxidation test in human leukocytes.

Results are expressed as mean \pm S.D. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. *Compared to N.C. ** Compared to the P.C. NC: negative control (PBS buffer pH 7.4); P.C.: positive control (hydrogen peroxide 100 μ M); CES: Crude summer extract; CEA: Crude autumn extract; CEW: Crude winter extract and CESP: Crude spring extract.

Fig S3 Result of the Nitric Oxide Test using Gries reagent in human leukocytes.

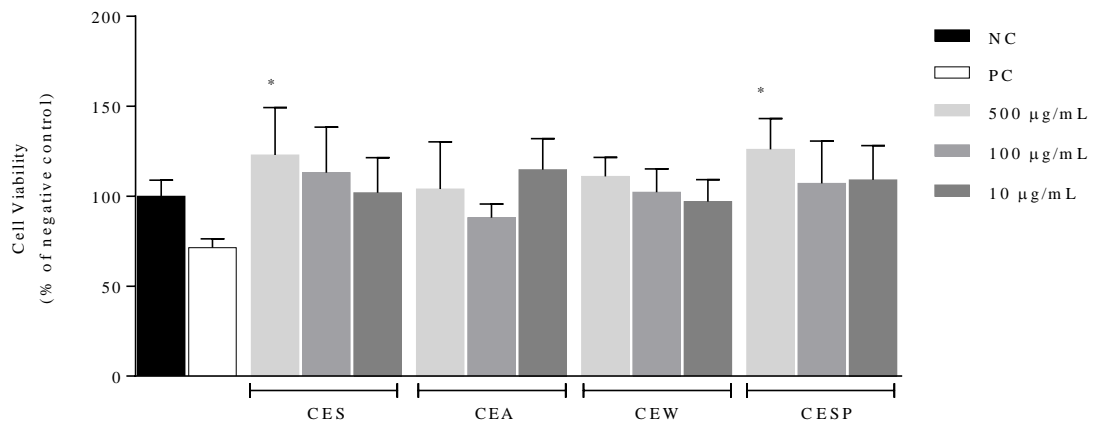
Results are expressed as mean \pm S.D. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$.
*Compared to N.C. NC: negative control (PBS buffer pH 7.4); P.C.: positive control (hydrogen peroxide 100 μ M); CES: Crude summer extract; CEA: Crude autumn extract; CEW: Crude winter and CESP: Crude spring extract.

Fig S4 The relative concentration of free radicals at different concentrations of the crude extract of *R. brasiliensis*.



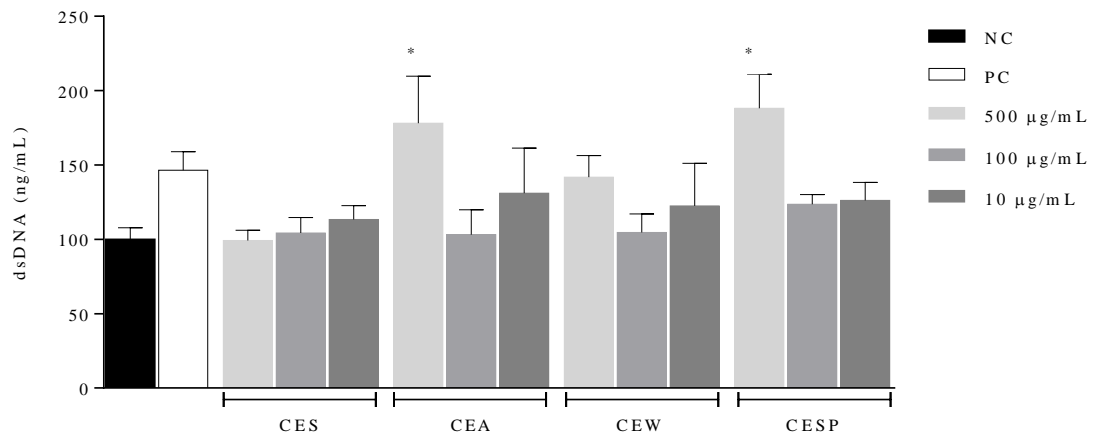
Results are expressed as mean \pm S.D. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. *Compared to N.C. ** Compared to the P.C. NC: negative control (PBS buffer pH 7.4); P.C.: positive control (hydrogen peroxide 100 μ M); CES: Crude summer extract; CEA: Crude autumn extract; CEW: Crude winter extract and CESP: Crude spring extract.

Fig S5 Cell viability of leukocytes measured by the MTT colorimetric assay after exposure to different concentrations of *R. brasiliensis*.



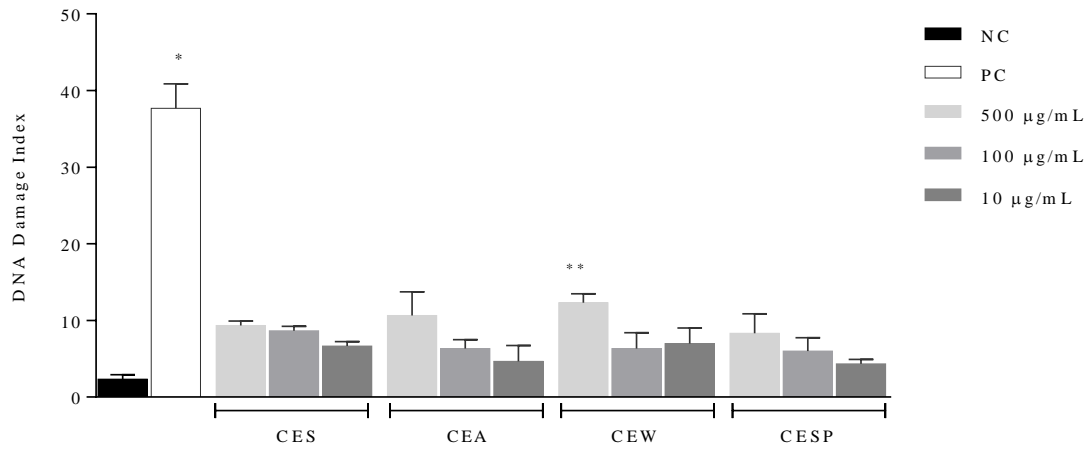
Results are expressed as mean \pm S.D. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. *Compared to N.C. NC: negative control (PBS buffer pH 7.4); P.C.: positive control (hydrogen peroxide 100 μ M); CES: Crude summer extract; CEA: Crude autumn extract; CEW: Crude winter extract and CESP: Crude spring extract.

Fig S6 Determination of free dsDNA levels in the extracellular medium after exposure to different concentrations of *R. brasiliensis* after 24 h.



Results are expressed as mean \pm S.D. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. *Compared to N.C. NC: negative control (PBS buffer pH 7.4); P.C.: positive control (hydrogen peroxide 100 μ M); CES: Crude summer extract; CEA: Crude autumn extract; CEW: Crude winter extract and CESP: Crude spring extract.

Fig S7 Alkaline comet assay for human leukocytes after exposure to different concentrations of *R. brasiliensis* extract.



Results are expressed as mean \pm S.D. The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$. *Compared to N.C. ** Compared to the P.C. NC: negative control (PBS buffer pH 7.4); P.C.: positive control (hydrogen peroxide 100 μ M); CES: Crude summer extract; CEA: Crude autumn extract; CEW: Crude winter extract and CESP: Crude spring extract.

1 5.2 ARTIGO II: Publicado no periódico *Regulatory Toxicology and Pharmacology*

2

3 *Richardia brasiliensis* Gomes: phytochemical characterization, antiproliferative capacity and
4 *in vitro* and *in vivo* toxicity

5

6 Rafaela Castro Dornelles^{a*}, Camille Gaube Guex^a, Rachel de Lima^b, Daniele Rubert Nogueira-
7 Librelotto^c, Rosana Casoti^d, Ana Martiele Engelmann^e, Camila Benaduce Emanuelli Mello^e,
8 Julia Brandt de Souza^a, Cinthia Melazzo de Andrade^e, Alencar Kolinski Machado^f, Micheli
9 Mainardi Pillat^g, Melânia Palermo Manfron^{b,c}, Liliane de Freitas Bauermann^{a,b}

10

11 ^aPrograma de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa
12 Maria, RS, Brasil. ^bPrograma de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade
13 Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. ^cDepartamento de Farmácia Industrial,
14 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. ^dUniversidade Federal de
15 Pernambuco, Recife, PE, Brasil; ^ePrograma de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Centro
16 de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
17 ^fUniversidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil. ^gDepartamento de Microbiologia e
18 Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

19

20 * Corresponding author

21 E-mail address: rafacdornelles@gmail.com

22 Phone: +55 (55) 981499374

23 Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa
24 Maria, RS, Brasil, Avenida Roraima, 1000, prédio 21, 97105-900.

25 ORCID: 0000-0002-7638-4026

C.E.A: Crude extract of aerial parts; C.E.R: Crude extract of roots; SISGEN: *Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado*; SMDB: Herbarium of the Department of Biology; D.N.P: Dictionary of Natural Products; CONCEA: *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*.

ABSTRACT

Richardia brasiliensis, known as *poaia branca*, is a medicinal species widely distributed throughout Brazil and used in folk medicine. However, studies on its toxicity are practically non-existent, and little is known about its biological activity. This study aimed to investigate its phytochemical compounds, assess its *in vitro* and *in vivo* toxicities, and determine its antiproliferative activity. UHPLC-ESI-HRFTMS performed the phytochemical characterization, and the antiproliferative activity was analyzed in different tumor cell lines. *In vitro* toxicity was evaluated in PBMC cells, and *in vivo* acute and repeated dose toxicity was evaluated according to OECD guidelines. It was identified alkaloids and terpenes as significant compounds. Regarding its antiproliferative activity, the human melanoma strain decreased its viability by about 95%. *In vitro* toxicity showed that the extracts maintained the viability of PBMCs; however, higher concentrations were able to increase the production of dsDNA quantity. *In vivo* tests showed no mortality nor signs of toxicity; the alterations found in hematological and biochemical parameters are within the standards for the species. The results indicate that *R. brasiliensis* has a good effect against the tumor cell line; still, more studies on its toxicity at higher concentrations are needed.

Keywords: *Poaia-branca*. Rubiaceae. Medicinal plant. Active substances. Phytochemical analysis. Biological activity. Antiproliferative. Toxicity. *In vitro* test. Animal model.

1. Introduction

Medicinal plants are used by a large part of the world population to treat symptoms or cure illnesses. In addition to being easily accessible, it is believed that medicinal plants do not cause adverse effects because they are natural; however, there is a significant gap in relation to scientific knowledge about the toxicological effects that these plants cause on human bodies. Nonetheless, natural sources such as plants and their isolated active substances are agents used as prototypes for a variety of drugs that are currently available, such as substances used in cancer treatment, of which over 60% come from natural sources (Farag *et al.*, 2020; George *et al.*, 2017).

In general, medicinal plants have a complex chemical structure arising from different secondary metabolic pathways directly related to environmental parameters, defense mechanisms, development stages, and species-specific metabolic pathways (Sampaio *et al.*, 2016). This fact reflects the vast diversity of compounds present in plants used in the most diverse biological functions.

Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae) is a species native to South America, found from the Andes Mountains to the Atlantic Coast and discontinuously in several Brazilian states, mainly in regions with intense agricultural activities popularly known as *poaia branca* or *ipeca*. In traditional medicine, it is used to treat diabetes, as anti-hemorrhoids, antiemetics, and

expectorants, in deworming, and in the treatment of eczema and burns (Matias *et al.*, 2018; Morais *et al.*, 2013). However, few scientific studies describe the use of the species in folk medicine and its real pharmacological effects, in addition to practically no research on its possible toxic effects.

In our bibliographic research, no studies of *R. brasiliensis* were found regarding the safe use of extracts from this species. Therefore, this study aimed to characterize phytochemical compounds in extracts of aerial parts and roots of *R. brasiliensis*, as well as to evaluate their toxicity *in vitro* and *in vivo* models and to determine the antiproliferative activity of the extract of aerial parts against tumor cell lines.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts and roots of *Richardia brasiliensis* were collected at UFSM campus, RS, Brazil (S29°43.277' W053°42.844'), and identified by Dr. Thais Scott do Canto-Dorow. A sample was deposited in the herbarium of the Department of Biology (SMDB) of UFSM, under registration number 13966. This study is registered in the *Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen), under number A2F514D.

2.2. Obtention of extracts

The plant material was dried at 45 °C in a circulating air oven and then ground, and its extracts were prepared by maceration, using 70% alcohol for approximately 30 days, with solvent renewal every seven days. After removing the alcohol through rotaevaporation (~40 °C), the extracts were lyophilized and stored for later use. A qualitative chemical analysis was performed on the crude extract of aerial parts (CEA) and roots (CER) of *R. brasiliensis*. For the other biological assays, only the CEA was used.

2.3. Phytochemical analysis of *Richardia brasiliensis* by UHPLC-ESI-HRFTMS

The extracts of aerial parts and roots of *R. brasiliensis* were dissolved in methanol (HPLC grade) at 1 mg/mL then filtered through PTFE (0.22 μ m). The samples were analyzed via high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-ESI-HRFTMS) (Accela-Exactive Plus, Thermo Scientific®). The chromatographic analysis of the extracts was performed on a C-18 ACE® analytical column (3.0 \times 150 mm, 3 μ m) placed inside an oven maintained at 40 °C. The analysis used 0.1% aqueous formic acid as solvent A and acetonitrile with 0.1% formic acid as solvent B under the following gradient elution program: 10-100% of solvent B for 30 min in a linear gradient, 400 μ L/min flow rate. The electrospray ionization method was used for mass spectrometry under the following conditions: spray voltage = 3.6 kV in positive mode ionization, the capillary temperature at 320 °C, and mass range: m/z 120-1500.

2.4. Antiproliferative activity

2.4.1. Cell culture and treatments

In order to assess the *in vitro* antiproliferative activity, tumor cell lines from different origins such as human melanoma (A375), human epithelial cervical cancer (HeLa), breast cancer (MCF-7), colorectal cancer (HT-29), and human glioblastoma (U87) were used. A non-tumor strain of murine fibroblasts (3T3) was also used; the cells were cultured as Nogueira *et al.* (2013) described. For the treatments, cells were seeded in 96-well plates, and CEA was added at concentrations of 75, 125, 250, 500, and 1000 μ g/mL and incubated for 24 h. As a negative control, a DMEM medium + 5% FBS was used.

2.4.2. Cell viability using MTT

An evaluation of cellular viability was performed using the MTT method (2,5-diphenyl-3-tetrazolium bromide (4,5-dimethyl-2-thiazolyl)), as described by Mosmann (1983). Cell lines were incubated with CEA for 24 h, and MTT was added at a concentration of 0.5 mg/mL and incubated for 3 h at 37 °C with 5% CO₂. After removing the dye and adding DMSO, the plates were incubated for 10 min at room temperature with gentle shaking, and the absorbance of the resulting solutions was read at 550 nm. Cell viability was calculated as the percentage of tetrazolium salt reduction per viable cell in each sample against the untreated cell control. The

IC₅₀ (concentration causing 50% death of the cell population) was calculated for each cell line by curve fitting of percent cell survival against concentrations of extract. Finally, the degree of selectivity of the extract against tumor cell lines is expressed by the Selectivity index (SI) (Badisa *et al.*, 2006; Nogueira-Librelo *et al.*, 2016), which was calculated as follows:

Selectivity index (SI) = IC₅₀ in non-tumor cell line/ IC₅₀ in tumor cell line

The human melanoma cell line A375 was again submitted to the MTT assay as described above; however, it remained in contact with CEA for a period of 72 h.

2.4.3. Apoptosis

The human melanoma cell line A375 was also used as an *in vitro* model to investigate the adjacent mechanisms of apoptosis, with sensitivity to the CEA. To this end, the cells were cultured as described by Nogueira *et al.* (2013) and incubated for 24 h with the extract at the final concentrations of 75, 125, and 250 µg/mL. To detect apoptosis, a commercial kit of Annexin PE/7-AAD was used, and its application followed the manufacturer's instructions.

2.5. *In vitro* toxicity

2.5.1. Cell culture and treatments

For *in vitro* toxicity assays, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from blood samples from healthy adults at the Laboratório de Análises Clínicas of the *Universidade Franciscana* (LEAC-UFN) used. The project was approved by the Ethics Committee for Human Beings (CAAE:31211214.4.0000.5306) of the *Universidade Franciscana*, Santa Maria, in the state of Rio Grande do Sul.

PBMCs were separated from whole blood by density difference using the Ficoll Histopaque-1077 reagent. Afterward, they were cultured according to Montagner *et al.* (2010). The CEA was evaluated at 500, 100, 10, 1, and 0.1 µg/ml concentrations. In all assays, cells remained exposed to treatments for 24 h at the determined concentrations, and cell suspensions were kept at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. A PBS buffer with pH 7.4 was employed as a negative control, and positive control with 100 µM hydrogen peroxide was used. All parameters were evaluated in triplicate.

2.5.2. Cell viability

The MTT assay was used to determine the viability of PBMCs against the CEA as previously described (Mosmann, 1983).

2.5.3. Total free radicals

Total free radicals were quantified using the 2'-7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) spectrofluorimetric method according to Barry and Matthew, 2004; Bass, 1983; Esposti, 2002.

2.5.4. Nitric oxide levels

To evaluate the nitric oxide production (NO), the PBMCs remained in contact with a Griess reagent (5% phosphoric acid, 1% sulfanilamide, and 0.1% *N*-1-Naphylethylenediamine-bihydrochloride) for 15 min at room temperature. Absorbance was measured at 540 nm (Choi *et al.*, 2012).

2.5.5. DNA quantification

For the quantification of double-stranded DNA released in the medium after the contact of the CEA with the cells, the PicoGreen[®] assay was employed. In this assay, an ultrasensitive fluorescent reagent was added to the supernatant, and readings were taken in a fluorimeter at the wavelengths of 480 nm (excitation) and 520 nm (emission) (Há *et al.*, 2011).

2.6. *In vivo* toxicity

2.6.1. Experimental animals

Female and male Wistar rats (weighing 80-150 g) were obtained from the Animal House of the UFSM. The animals were randomly separated by sex, placed in polypropylene boxes, and acclimated for one week before starting the treatments. The animals were kept in a room with a controlled temperature (22 ± 2 °C), with a 12:12h light/dark cycle, and food and water

ad libitum. The tests were performed following the ethical principles of animal experimentation developed by the CONCEA. To develop the experimental protocol, the project was submitted and approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of UFSM under the number 4738280618.

2.6.2. Acute toxicity

The acute oral toxicity of the CEA was determined following Guideline 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). Nulliparous and non-pregnant female Wistar rats were used and divided into test and control groups (n = 6). Before starting treatment, the animals were weighed and then fasted for 6h; CEA was administered in a single dose of 2000 mg/kg, while a control group received distilled water (2 mL/kg), both via oral (gavage). After administration, the animals were observed individually during the first 30 min and subsequently during the 14 days of the experiment, monitoring weight, feed intake, and physical and behavioral changes.

On the 15th day, the animals were anesthetized for euthanasia, and blood was collected by cardiac puncture to analyze hematological and biochemical parameters. The relative weight of the organs of each animal was determined according to the equation: relative weight = absolute organ weight (g) / body weight (g) X 100.

2.6.3. 28-day repeated dose toxicity

For the repeated dose test, 20 females and 20 male Wistar rats were used, following the OECD Guideline 407 (OECD, 2008). The animals were divided into four experimental groups: three test groups and a control group (n = 5 per group/by gender). The CEA was administered at doses of 200, 400, and 600 mg/kg of body weight, and to the control group was administered distilled water (3 mL/kg); treatments were oral and daily for 28 days. Individual observations and monitoring of weight, feed consumption, and physical and behavioral changes were performed as described for the study of acute oral toxicity. On the 29th day, the animals were euthanized, and procedures were performed as described for the acute oral toxicity test. Vital organs such as the liver and kidneys were excised, weighed, and stored for oxidative damage markers.

2.6.4. Hematological and biochemical parameters

Blood collected in EDTA tubes was used for the hematological analysis, which included: hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), total red blood cells (RBC), mean corpuscular volume (MVC), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), platelets (PLT), and total leukocytes (BC-2800 Vet – Auto Hematology Analyzer, Mindray). The leukocyte differential was performed under immersion microscopy, at 1000x magnification, using blood smears made on a glass slide and stained with Diff-Quick (Laborclin). Total plasma proteins (PPT) were verified by refractometry, using the plasma portion of the microhematocrit capillary.

The blood fraction without anticoagulant was centrifuged to obtain serum, which was used to determine the activity levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CRE), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (CHOL), urea, total serum protein (T.P.), triglycerides (T.G.), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) and gamma-glutamyl transferase (GGT). To this end, commercial kits (Bioclin®) and an automated biochemical analyzer (Mindray® BC 120) were used.

2.6.5. Oxidative damage markers

2.6.5.1. Carbonylated proteins and lipid peroxidation

Carbonylated proteins was estimated in liver and kidney spectrophotometrically following reaction with DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine). The test was performed in triplicate and the absorbance reading at 370 nm (Reznick and Packer, 1994). Lipid peroxidation (LPO) was estimated using the thiobarbituric acid method (TBARS). Readings were performed in triplicate at the wavelength of 532 nm following Draper and Hodley (1990). The protein concentration of each sample was determined using Lowry assay (Lowry *et al.*, 1951).

2.6.5.2. Enzyme activities

The enzymatic activities of catalases (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the livers and kidneys of the animals were evaluated. The CAT test was carried out according to

the method described by Aebi (1984). To determine the SOD activity, the method described by Sun and Zigman (1978) was used with some modifications, and the readings were performed at different times at 480 nm.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). Differences between groups were determined by Student's *t*-test and by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *posthoc* test. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, and Dunn's methods were used as statistical tests when the requirements to perform a parametric test were not satisfied (GraphPad Prism Software, Inc., version 6). The differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Phytochemical analysis of *Richardia brasiliensis* by UHPLC-ESI-HRFTMS

After UHPLC-ESI-HRFTMS analysis, alkaloids and terpenes were detected as the main compounds, besides other class compounds such as phenylpropanoid derivatives, flavonoids, coumarins, phenylethanoid derivatives, benzoic acid derivatives, and iridoids. A more detailed analysis of each extract shows that the aerial parts have more significant accumulations of suggestive compounds, phenylpropanoid derivatives, alkaloids, chromanes, and terpenes. The analysis of the root extract showed an accumulation of suggestive compounds such as alkaloids and diterpenes (Figure 1 and supplementary material).

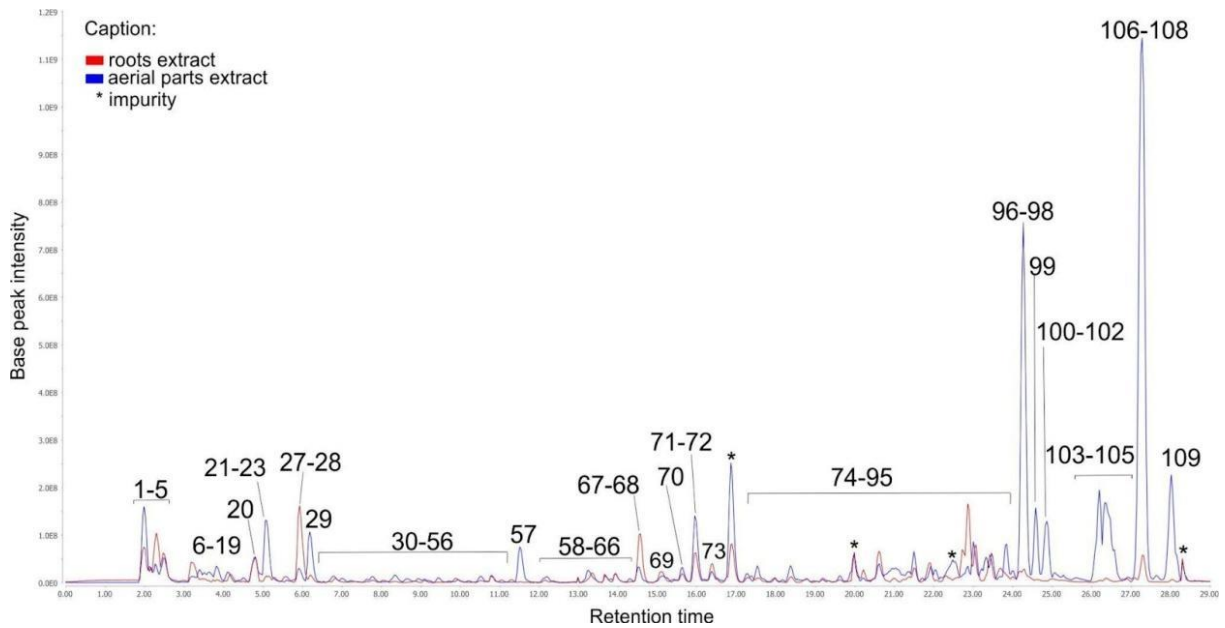


Fig 1. Chromatogram of the extracts of aerial parts (peaks in blue) and roots (peaks in red) of *R. brasiliensis*, analyzed by UHPLC-ESI-HRFTMS.

3.2. Antiproliferative activity

In evaluating antiproliferative activity, the CEA had a more significant effect on the A375 cell line, with an IC_{50} of 344.62 $\mu\text{g/mL}$ in assays performed over a 24 h period. In HeLa, MCF-7, and U87 cells, IC_{50} values of 392.40, 528.58, and 932.30 $\mu\text{g/mL}$, respectively, were obtained. The HT-29 colorectal cancer cell lineage showed an $IC_{50} > 1000$ $\mu\text{g/mL}$, demonstrating its resistance to treatment with CEA. The non-tumor 3T3 strain also showed low sensitivity to CEA treatment, achieving an IC_{50} value of 760.62 $\mu\text{g/mL}$. The CEA was more effective in decreasing cell viability at the highest concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$, with viability values of 21.8%, 14%, and 15.1% for the A375, HeLa, and MCF-7 strains, respectively. For the other tumor strains evaluated (HT-29 and U87), the extract seems not to have been effective in decreasing cell viability ($> 50\%$), even at a high concentration (Figure 2A).

In this study, the degree of selectivity of the extract was expressed by the selectivity index (SI), calculated as the ratio between the IC_{50} of CEA in non-tumor cells and IC_{50} in tumor cells. As the value of SI demonstrates the differential activity of a compound, the greater the index value is, the better it is. The SI value of CEA for each tumor cell line was determined and is reported in Table 1. The SI data presented clearly evidenced the highest degree of selectivity of CEA in the melanoma cells (A375 cell line), which have a SI greater than 2.0.

The A375 cell line had the lowest IC_{50} among the strains tested within 24 h. Thus, the MTT assay was repeated using the human melanoma strain after 72 h incubation. Overall, our

results demonstrated a dose-dependent inhibition in both incubation periods, in which the CEA was effective at the highest concentrations, decreasing cell viability by about 95% after 72 h of contact (Figure 2B). The IC_{50} obtained for the extract was 258.94 $\mu\text{g/mL}$.

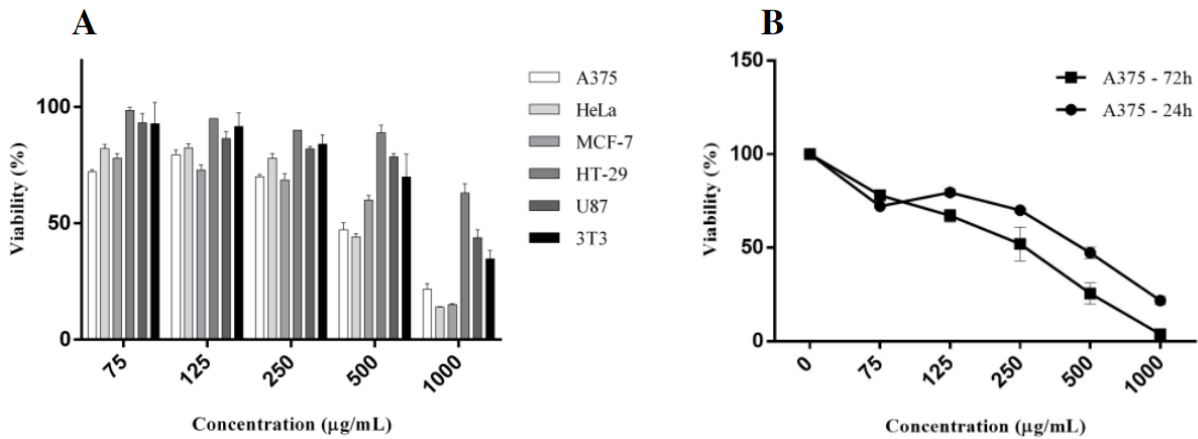


Fig 2. Evaluation of cell viability by MTT colorimetric assay. (A) after 24h of incubation with crude extract of aerial parts of *R. brasiliensis* in cancer and healthy cells. A375 (human melanoma); HeLa (cervical cancer); MCF-7 (breast cancer); HT-29 (colorectal cancer); U87 (human glioblastoma); and 3T3 (murine fibroblast). (B) comparative antiproliferative effects on A375 cell line (human melanoma) after 24 and 72 h of incubation with the CEA. Data are expressed as mean \pm SD.

Table 1. Antiproliferative activity of CEA expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) and selectivity index (SI) values.

Cell line	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Selectivity index (SI)
A375	344.62	2.21
HeLa	392.40	1.94
MCF-7	528.58	1.44
U87	932.30	0.81
HT-29	> 1000	< 0.76
3T3	760.62	-

3.3. Apoptosis

Double staining with Annexin PE/7-AAD was used to distinguish the apoptotic and non-apoptotic cell population and determine whether the cytotoxicity observed in the A375 line was due to apoptosis. Cells treated with the CEA showed an increase in the population of apoptotic cells, and it was possible to observe apoptosis in over 80% of the cells at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$, demonstrating that higher concentrations were cytotoxic to cells of the A375 line. The concentration of necrotic cells was considered low (Figure 3).

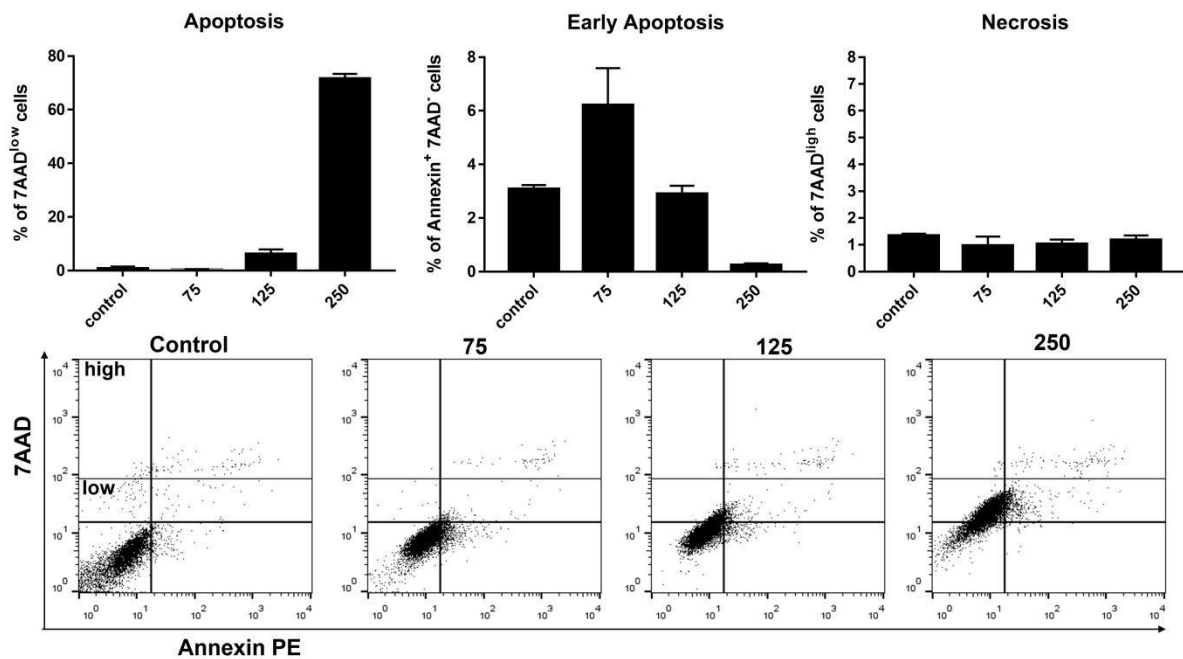


Figure 3: Annexin PE/7-AAD staining used to assess the mode of cell death in A375 cells (human melanoma), after 24 h of incubation with CEA at the final concentrations of 75, 125, and 250 $\mu\text{g/ml}$. Data are expressed as mean \pm SD.

3.4. *In vitro* toxicity

Regarding cell viability assessed by the MTT method, no significant changes were observed compared to the negative control (N.C.) (Figure 4A). Regarding the ROS levels, results demonstrate that the CEA could not increase it even at the highest concentration tested, resembling thus the behavior of N.C. cells (Figure 4B). Concerning NO, the CEA showed a slight increase in levels at 500 and 100 $\mu\text{g/ml}$; however, it did not differ from N.C. (Figure 4C). The assay that evaluated the DNA content released in the medium after contact with the extract also showed an increase in levels at a 500 $\mu\text{g/ml}$ concentration, differing from the N.C. (Figure 4D).

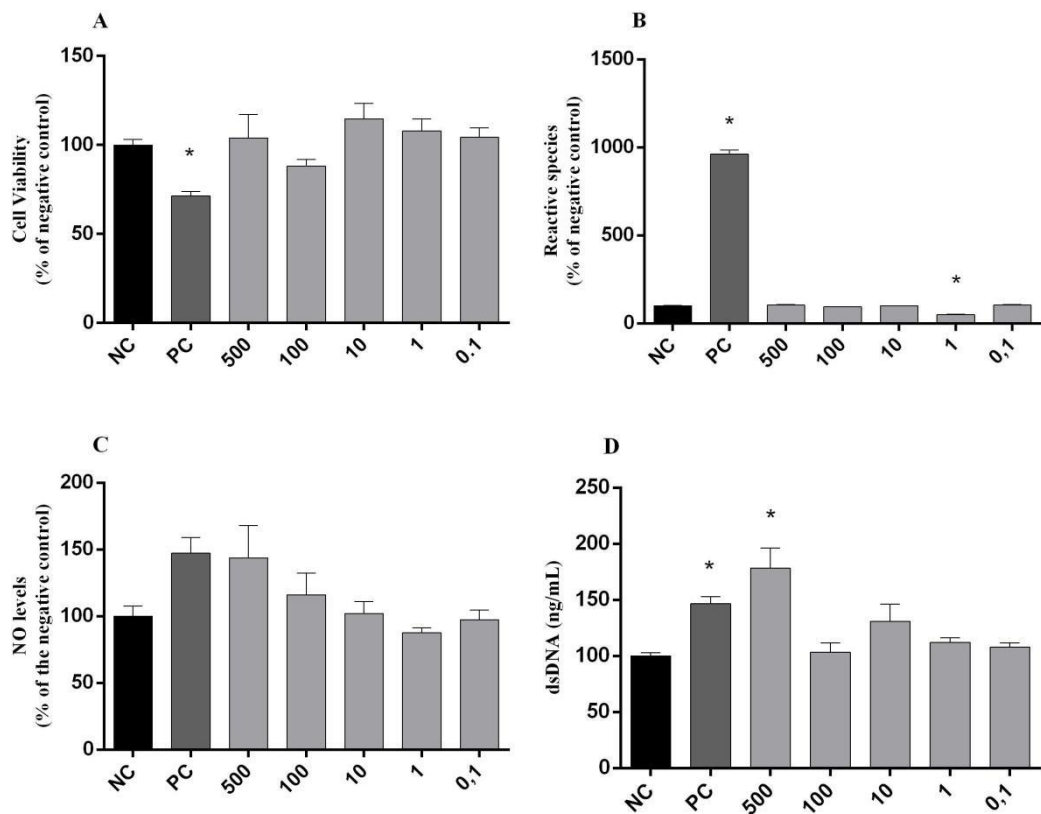


Fig 4. *In vitro* toxicity evaluation of PBMC cells exposed to different concentrations of CEA for 24 h. (A) cell viability by MTT colorimetric assay; (B) total ROS levels; (C) determination of NO levels; (D) quantification of extracellular dsDNA. NC: negative control; P.C.: positive control. *Different from the negative control. Data are expressed as mean \pm SD.

3.5. *In vivo* toxicity

3.5.1. Acute oral toxicity

After administration of CEA at a single dose of 2000 mg/kg, no signs of toxicity were observed, and no deaths were recorded. No changes in the parameters analyzed were observed, except for the monocyte levels in treated animals, which was significantly different from the control group.

3.5.2. Toxicity of repeated doses in 28 Days

It was observed no mortality or signs of toxicity in animals treated repeatedly with CEA. Animals of both sexes showed a typical trend about bodyweight; only the spleen in male

animals had a significant decrease between the 600 mg/kg group and the other test groups. During necropsy, the organs showed normal appearance and morphology.

About hematological parameters, most of them were average when compared to the control group. There was a significant difference in females, with an increase in PLT in the 200 mg/kg group, and, in males, a decrease in PPT content was observed in the 600 mg/kg group, differing from the control group (Table 2).

With biochemical parameters, there was an increase in ALP (400 mg/kg group) and a reduction in the 600 mg/kg group, both differing significantly from the control group. There was a reduction in AST enzyme levels in these same groups and a decrease in CRE levels in the 400 mg/kg group, differing from the others. In males, the only significant change found was in the total protein levels of the 600 mg/kg group, in which levels were reduced. The other parameters remain unaltered (Table 2).

Regarding oxidative parameters, both females and males, in general, showed a reduction in levels of MDA and carbonyl proteins in both analyzed organs, with significant differences between the levels of carbonyl proteins in the kidneys of females in the 600 mg/Kg group and the livers of male rats from the 400 and 600 mg/kg groups. About the evaluation of SOD and CAT enzymes, there was a general increase in these enzymes. For male rats, there was an increase in the levels of CAT in the kidney of the 400 and 600 mg/kg groups and a decrease in the SOD enzyme levels of these same groups, differing significantly from the control group.

Table 2. Hematological and biochemical parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at 200, 400, and 600 mg/kg doses.

Hematological parameters	Groups			
	Control	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
Female				
RCB ($10^6/\mu\text{L}$)	7.79 ± 0.44	7.87 ± 0.23	7.66 ± 0.48	7.95 ± 0.47
HGB (g/dL)	15.12 ± 0.67	15.30 ± 0.76	14.70 ± 1.26	15.02 ± 0.97
HCT (%)	50.70 ± 4.24	48.80 ± 2.40	47.04 ± 3.01	48.70 ± 3.76
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1.014 ± 99.32	1.420 ± 178.77 ^{a,b,c}	1.088 ± 69.05	1.093 ± 77.38
PPT (mg/dL)	7.32 ± 0.30	7.10 ± 0.62	6.80 ± 0.14	7.00 ± 0.46
WBC ($/\mu\text{L}$)	8.62 ± 1.59	8.42 ± 1.31	9.14 ± 1.32	7.12 ± 1.07

Biochemical parameters	Groups			
	Control	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
ALP (mg/dL)	67.40 ± 5.36	69.5 ± 3.10 ^c	70.33 ± 11.93 ^c	50.40 ± 3.28 ^a
ALT (U/L)	31.00 ± 4.35	29.40 ± 3.50	24.80 ± 10.28	29.00 ± 4.24
AST (U/L)	78.40 ± 10.35	61.00 ± 5.70 ^a	55.21 ± 8.01 ^a	60.20 ± 4.32 ^a
CRE (mg/dL)	0.72 ± 0.08	0.72 ± 0.04 ^b	0.52 ± 0.14 ^a	0.70 ± 0.07 ^b
URE (mg/dL)	53.80 ± 2.48	55.60 ± 3.20	50.00 ± 9.13	52.00 ± 3.80

Hematological parameters	Groups			
	Control	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
Male				
RCB (10 ⁶ /μL)	7.93 ± 0.39	7.98 ± 0.39	7.96 ± 0.18	7.86 ± 0.25
HGB (g/dL)	14.94 ± 0.84	15.22 ± 0.60	15.20 ± 0.15	14.94 ± 0.34
HCT (%)	46.72 ± 2.55	46.82 ± 2.24	47.06 ± 1.66	46.56 ± 1.71
PLT (10 ³ /μL)	882.00 ± 50.60	882.25 ± 50.68	935.40 ± 57.79	945.00 ± 33.71
PPT (mg/dL)	7.08 ± 0.33	6.75 ± 0.1	6.72 ± 0.22	6.56 ± 0.26 ^a
WBC (/μL)	10.34 ± 1.17	9.67 ± 6.94	9.90 ± 1.50	10.12 ± 1.18

Biochemical parameters	Groups			
	Control	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
ALP (mg/dL)	126.20 ± 5.71	113.00 ± 27.38	102.8 ± 14.56	120.00 ± 16.38
ALT (U/L)	47.4 ± 8.08	43.75 ± 2.21	46.40 ± 8.08	46.60 ± 3.91
AST (U/L)	85.60 ± 6.18	79.25 ± 3.77	82.40 ± 18.64	74.00 ± 6.92
CRE (mg/dL)	0.82 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00
URE (mg/dL)	42.40 ± 4.87	47.75 ± 4.99	47.60 ± 4.56	47.20 ± 7.85

Results are expressed as mean ± S.D. Values were significantly different when $p < 0.05$. ^aCompared with the control group. ^bCompared with the 400 mg/kg group. ^cCompared with the 600 mg/kg group.

4. Discussion

Research on medicinal plants is necessary and is increasingly gaining worldwide attention due to its wide variety of uses in treating various diseases. Besides, the use of natural substances in the prevention of diseases, such as substances with decisive chemopreventive actions that intervene in various stages of carcinogenesis (George *et al.*, 2017; Varol, 2019; Vuong *et al.*, 2014) or act as antioxidants, suppressing oxidative stress is crucial (Chikara *et al.*, 2018; Zhang and Tsao, 2016).

Richardia brasiliensis is little explored concerning its pharmacological potential and bioactive compounds. In this study, after UHPLC-ESI-HRFTMS analysis, the main classes of compounds detected in the CER and CEA were alkaloids and terpenes and other substances such as phenylpropanoids, flavonoids, coumarins, phenylethanoid derivatives, benzoic acid derivatives, and iridoids. However, the complex chemical matrix of the extracts showed dozens of compounds of different polarities, which made it difficult to identify their composition. Despite using the dereplication method, the identification of substances available in the species was difficult to determine; besides the complex matrix of the extracts, most of the compounds suggested here were not described for the taxon (Gallon *et al.*, 2018; Kokkotou *et al.*, 2014).

The Rubiaceae family is characterized by having a rich diversity of secondary metabolites, like iridoids, terpenoids, and flavonoids, which have shown potent pharmacological actions such as anticancer action due to their availability and low side effects (Braicu *et al.*, 2020; Dutta *et al.*, 2019).

Cancer cells are characterized by unlimited proliferation and deregulation of multiple signaling pathways, including processes such as apoptosis and cell cycle modulation, commonly leading to malignant tumors (Mishra *et al.*, 2018; Moura *et al.*, 2017). Phytochemical substances from plant species can inhibit carcinogenic processes by interfering with one or several cellular pathways at different levels (Iqbal *et al.*, 2019; Tanaka, 2013).

Identifying natural substances with an antiproliferative effect against tumor strains is a strategy that has been pursued in the search for new anticancer products. In our study, there was a dose-dependent inhibition, in which higher concentrations of the extracts could efficiently decrease the viability of the A375, HeLa, and MCF-7 strains. These results indicate a particular specificity of the extracts toward some strains since the antiproliferative effects were not pronounced in other tumor and non-tumor strains studied. Indeed, the SI evidenced the highest selective antiproliferative potential of CEA in the A375 cell line, as a value of 2.21 was

obtained. It is worth mentioning that as the higher the SI, the more promise an extract holds (Koch *et al.*, 2005). The SI for the HeLa and MCF-7 tumor cells was in the range of 1.40 to 1.95, indicating a mildly selectivity. In contrast, U87 and HT-29 tumor cells did not displayed substantial sensitivity to the extract antitumor potential, and the SI values were lower than 1.0, which means lack of selective cytotoxicity.

One of the critical points in the search for anticancer drugs are markers that act to induce apoptosis and prevent cancer progression, as apoptosis is one of the primary mechanisms regulating cell growth, development, and differentiation and also acts directly on homeostasis (Dutta *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020; George *et al.*, 2017). In our study, the CEA proved to be promising since it induced apoptosis in more than 80% of the cells of the studied cell line.

Despite all the benefits arising from the use of plants and their isolated bioactive compounds, it is necessary to know their safety profile and determine possible toxic effects, whether on cells or living organisms. The literature has few studies on *R. brasiliensis*, and its toxicological profile is practically unknown.

In vitro cytotoxicity and genotoxicity assays can provide evidence of the toxicity of different compounds and extracts, and one of the most common targets to be studied in these assays are human PBMC cells (Discson *et al.*, 2015). Overall, the CEA was relatively safe concerning cell viability, as it kept cells viable even at higher concentrations. ROS levels remained low regarding oxidative parameters, while the small changes observed in NO levels did not differ from the negative control. However, when dsDNA levels released in the medium were evaluated, it was observed that the CEA displayed some toxicity towards the cells at the highest tested concentration indicating that concentrations of CEA likely to alter membrane permeability (Copetti *et al.*, 2022).

In vivo toxicity tests provide preliminary data on the toxicity of single-dose and repeated-dose substances. In the acute toxicity study, since the animals survived until the scheduled euthanasia, the evaluated extract was classified in category 5, with an estimated LD₅₀ between 2000 and 5000 mg/kg and low toxicity according to OECD 423 (OECD, 2001).

In the 28-day repeated dose toxicity test, no death was recorded, and the animals did not show signs of physical and behavioral changes that could indicate some sign of toxicity. Furthermore, despite some significant changes in the hematological, biochemical, and enzymatic parameters of the test groups compared to the control group, there is no indication of toxicity, as the data collected are within acceptable levels for the species (Lima *et al.*, 2014)

and the changes observed are possibly related to some individual variation of each animal, therefore being unrelated to the toxic effect of the extract.

Organ weight is an important parameter to be evaluated because it can refer to animals' physiological states and pathologies (Menegati *et al.*, 2016). There was a decrease in the spleen weight of male rats at the highest dose; hence this data could be indicative of some possible toxic effect after exposure to the extract, as it acts in the formation and filtering of blood and the storage of red blood cells and platelets (Adebiyi *et al.*, 2021). However, as the other parameters evaluated are within the normal range, further confirmation is needed.

The analysis of hematological parameters is essential because they are susceptible to toxic agents, which can undergo transient or permanent changes (Deyno *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2012). In general, there were no significant changes in female and male rats concerning these parameters.

A significant increase in platelets was observed solely in female rats treated with the lowest dose. Oliveira *et al.* (2020) also observed an increase in platelets at all tested dosages and attributed this increase to the high production and secretion of thrombopoietin, a hormone that regulates platelet production. For male rats, plasma proteins decreased at the highest dose, differing significantly from the other groups, but the values are within the ranges considered normal (Lima *et al.*, 2014).

Biochemical analyses are used to track possible liver and kidney damage after treatment, considering that these organs are involved in eliminating xenobiotic substances (Deyno *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020). Elevated activity levels of liver enzymes such as GGT, AST, and ALT and the appearance of clinical signs such as diarrhea, anorexia, and others, may be indications of intoxication with the tested drug (Oliveira *et al.*, 2020). In our study, some biochemical parameters such as ALP, AST, and creatine reduced their serum levels, but all are within the stipulated ranges for the species (Lima *et al.*, 2014). Typically, increased levels of these biomarkers are of more concern, as pathological processes can cause kidney and liver disorders, and an overload in the levels of these enzymes can be a sign of toxicity (Ribeiro *et al.*, 2020). With the dosages of urea and creatinine, the renal function markers of the test groups did not differ significantly from the control group, except females at the dosage of 400 mg/kg, in which creatinine decreased. These results demonstrate that the CEA does not show nephrotoxicity.

The changes in antioxidant defense mechanisms and oxidative stress markers are also parameters that provide data on the toxicity of extracts (Brondani *et al.*, 2017). Thus, our data

showed that the antioxidant enzymes SOD and CAT did not show significant changes, with the exception of levels in the kidneys of males at dosages of 400 and 600 mg/kg, which had an increase in CAT and a decrease in SOD. In addition, oxidative stress products such as lipid peroxidation or the presence of carbonyl proteins also maintained their levels, so that, even with a reduction in SOD levels, the first line of defense, no significant damage to macromolecules was observed. Thus, it is suggested that compounds present in CEA such as polyphenols, which act as potent antioxidants (Moriassi, *et al.*, 2021), maintained a balance in the antioxidant/oxidant system (Lima, *et al.*, 2018).

5. Conclusion

In summary, the hydroethanolic extracts of *Richardia brasiliensis* have active substances from its secondary metabolism, such as alkaloids, terpenes, and polyphenols, which confer critical biological actions. These were promising findings, especially for human melanoma cells, whose viability the extracts could reduce. Regarding PBMC cells, the extracts showed a certain degree of cytotoxicity at the highest tested concentration but maintained cell viability and did not induce ROS production. In general, *in vivo* tests showed that the extracts did not cause signs of toxicity nor mortality to the animals. Under the conditions analyzed, there is evidence that the CEA has a certain degree of toxicity *in vitro* at higher concentrations, but they also have great potential to derail some types of tumor lines and be a possible source for developing new agents in the treatment of cancer. Further experimental analyses are needed in order to determine the mechanisms of action of these extracts.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank UFSM, Franciscan University, and Bioclin/Quibasa for the availability of material and human resources to develop the research. The authors also thank Dr. Thais Scott do Canto-Dorow for identifying the species.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors

References

- Adebiyi, O. A.; Ameh, D. A.; Onyike, E.; James, D. B., 2021. Acute and Chronic Toxicity Studies of Ethanol Leaf Extract of *Merremia Tridentata* (Linn) Hallier F. European J. Advanced Chemistry Research. 2, 14-20. <http://dx.doi.org/10.24018/ejchem.2021.2.3.62>.
- Aebi, H, 1984. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 105, 121-126. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- Badisa, R. B.; Ayuk-Takem, L. T.; Ikediobi, C. O.; Walker, E. H. 2006. Selective Anticancer Activity of Pure Licamichauxiiolic-B Acid in Cultured Cell Lines. Pharm Biol. 44, 141-145. <https://doi.org/10.1080/13880200600592301>.
- Barry, H.; Matthew, W., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br. J. Pharmacol. 142, 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.
- Bass, D. A.; Parce, J. W.; Dechatelet, L. R.; Szejda, P.; Seedes, M. C.; Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J Immunol 130, 1910-1917.
- Braicu, C.; Zanoaga, O.; Zimta, A. A.; Tigiu, A. B.; Kilpatrick, K. L.; Bishayee, A.; Nabavi, S. M.; Berindan-Neagoe, I., 2020. Natural compounds modulate the crosstalk between apoptosis- and autophagy-regulated signaling pathways: Controlling the uncontrolled expansion of tumor cells. Sem Cancer Biol. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.015>.
- Brondani, J. C.; Reginato, F. G.; Brum, E. S.; Vencato, M, S.; Lhamas, C. L.; Viana, C. da Rocha, M. I. U.; Bauermann, L. F.; Manfron, M. P. 2017. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. J. Ethnopharmacol. 202, 147-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.03>.
- Chikara, S.; Nagaprashantha, D. L.; Singhal, J.; Horne, D.; Awasthi, S.; Singhal, S. S., 2018. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. Cancer Lett. 413, 122-134. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.002.
- Choi, W. S.; Shin, P. G.; Lee, J. H.; Kim, G. D., 2012. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. Cell. Immunol. 280, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>.
- Copetti, P. M.; Bissacotti, B. F.; Gundel, S. S.; Bottari, N. B.; Sagrillo, M. R.; Machado, A, K.; Ourique, A. F.; Schetinger, M. R. C.; Silva, A. S. 2022. Pharmacokinetic profiles,

cytotoxicity, and redox metabolism of free and nanoencapsulated curcumin. *J Drug Deliv Sci Technol.* 72, 103352. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103352>.

Deyno, S.; Abebe, A.; Tola, M. A.; Hymete, A.; Bazira, J.; Makonnen, E.; Alele, P. E., 2020. Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. *BMC Complement. Med. Ther.* 20, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2794-z>.

Dicson, S. M.; Samuthirapandi, M.; Govindaraju, A.; Kasi, P. D. 2015. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 109, 1381-1393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.07.011>.

Draper, H. H.; Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I).

Dutta, S.; Mahalanobish, S.; Saha, S.; Ghosh, S.; Sil, P. C., 2019. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem. Toxicol.* 128, 240-245. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.012>.

Esposti, M. D., 2002. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods.* 26, 335-340 [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00039-7](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00039-7).

Fan, Z.; Wang, Y.; Yang, M.; Cao, J.; Khan, A.; Cheng, G., 2020. UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities. *Food Chem.* 318, 126512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126512>.

Farag, R. S.; Abdel-Latif, M. S.; Baky, H. A.; Tawfeek, L. S., 2020. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnol. Rep.* 28, e00536 <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00536>.

Gallon, M.; Trezzi, M. M.; Diesel, F.; Balbinot, Junior, A. A.; Pagnoncelli Junior, F. D. B.; Barancelli, M. V. J., 2018. Environmental factors' action on the germination process and initial growth of weeds of Rubiaceae Family. *S. Afr. J. Bot.* 117, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.009>.

George, B. P.; Abrahamse, H.; Hemmaragala, N. M., 2017. Phenolics from *Rubus fairholmianus* induces cytotoxicity and apoptosis in human breast adenocarcinoma cells. *Chem.-Biol. Interact.* 275, 178-183. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.08.005>.

Há, T. T. N.; Huy, N. T.; Murao, L. A.; Lan, N. T. P.; Thuy, T. T.; Tuan, H. M.; Nga, C. T. P.; Tuong, V. V.; Dat, T. V.; Kikuchi, M.; Yasunami, M.; Morita, K.; Huong, V. T. Q.; Hirayama, K., 2011. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One* 6, 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025969>.

Iqbal, J., Abbasi, A. B.; Ahmad, R.; BAtool, R.; Mahmood, T.; Ali, B.; Khalil, A. T.; Kanwal, S.; Shah, S. A.; Alam, M. M.; Bashir, S.; Badshah, H.; Munir, A. 2019. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. *Biomed. Pharmacother.* 109, 1381-1393. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.107>.

- Koch, A.; Tamez, P.; Pezzuto, J.; Soejarto, D. 2005. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *J Ethnopharmacol.* 101, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.03.011>.
- Kokkotou, K.; Ioannou, E.; Nomikou, M.; Pitterl, F.; Vonaparti, A. Siapi, E.; Zervou, M., Roussis, V. 2014. An integrated approach using UHPLC–PDA–HRMS and 2D HSQC NMR for the metabolic profiling of the red alga *Laurencia*: Dereplication and tracing of natural products. *Phytochemistry.* 108, 208-219. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.007>.
- Lima, R. L.; Guex, C. G.; da Silva, A. R. H.; Lhamas, C. L.; Moreira, K. L. S.; Casoti, R.; Dornelles, R. C.; da Rocha, M. I. U. M.; Veiga, M. L.; Bauermann, L. F.; Manfron, M. P. 2018. Acute and subacute toxicity and chemical constituents of the hydroethanolic extract of *Verbena litoralis* Kunth. *J Ethnopharmacol.* 224, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.012>.
- 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, 034601.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Matias, R.; Canale, F. S.; Corrêa, B. O.; Bono, J. A. M.; Oliveira, A. K. M.; Dourado, D. M.; Roel, A. R.; Rivero-Wendt, C. L. G.; Pedrinho, D. R., 2018. Chemical Constituents and Antifungal Potential of the *Richardia brasiliensis* (Gomes) Ethanolic Extract. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 21, 457-465.
- Menegati, S. E. L.; de Lima, F. F.; Traesel, G. K.; Souza, R. I. S.; dos Santos, A. C.; Aquino, D. F. S.; de Oliveira, V. S.; Vieira, S. C. H.; Cardoso, C. A. L.; Vieira, M. C.; Oesterreich, S. A., 2016. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. *J. Ethnopharmacol.* 194, 1096-1102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.003>.
- Mishraa, R.; Sharmaa, S.; Sharmaa, R. S.; Singha, S.; Sardesaib, M. M.; Sharmac, S.; Mishraa, V. 2018. *Viscum articulatum* Burm. f. aqueous extract exerts antiproliferative effect and induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. *J. Ethnopharmacol.* 219, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.005>.
- Montagner, G. F. F.; Sagrillo, M.; Machado, M. M.; Almeida, R. C.; Mostardeiro, C. P.; Duarte, M. M. F.; da Cruz, I. B. M., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. in Vitro.* 24, 1410-1416. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.010>.
- Morais, E. C.; Nogueira, L. F. B.; Leite, J. L. A.; Lucena, L. S.; Figueredo, F. G.; Guedes, G. M.; Tintino, S. R.; Souza, C. E.; Braga, M. F.; Lima, M. A.; Souza, F. H. T.; Dias, C. S.; Coutinho, H. D., 2013. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. *Indian J. Tradit. Know.* 12, 619-622.

- Moriasi, G. A.; Ileri, A. M.; Nelson, E. M.; Ngugi, M. P. 2021. *In vivo* anti-inflammatory, anti-nociceptive, and *in vitro* antioxidant efficacy, and acute oral toxicity effects of the aqueous and methanolic stem bark extracts of *Lonchocarpus eriocalyx* (Harms.). *Heliyon*, 7, e07145. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07145>.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay to cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Moura, A. P. G.; Beltrão, D. M.; Pita J. C. L. R.; Xavier, A. L.; Brito, M. T.; de Sousa, T. K. G.; Batista, L. M.; de Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Torre, A. D.; Duarte, M. C.; Tavares, J. F.; da Silva, M. S.; Sobral, M. V. 2017. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. *Pharm. Biol.* 54, 3093-3102. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1211154>.
- Nogueira, D. R.; Tavano, L.; Mitjans, M.; Pérez, L.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P., 2013. *In vitro* antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials*. 34, 2758-2772. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.005>.
- Nogueira-Librelo, D. R.; Scheeren, L. E.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Rolim, C. M. B. 2016. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles functionalized with a pH-responsive amphiphile improved the *in vitro* antineoplastic effects of doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 147, 326-335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.014>.
- Oliveira, N. A.; Sandini, T. M.; Cornelio-Santiago, H. P.; Martinelli, E. C. L.; Raspantini, L. E. R.; Raspantini, P. C.; Momo, C.; de Oliveira, A. L.; Fukumasu, H. 2020. Acute and subacute (28 days) toxicity of green coffee oil enriched with diterpenes cafestol and kahweol in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 110, 104517. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104517>.
- Organization for Economic Cooperation and Development - OECD, 2001. Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adopted: 17 December 2001.
- Organization for Economic Cooperation and Development - OECD, 2008. Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. Adopted: 16 October 2008.
- Ribeiro, N. E.; Pereira, P. S.; de Oliveira, T. B.; Lima, S. M. A.; Silva, T. M. S.; Santana, A. L. B.; do Nascimento, M. S.; Santisteban, R. M.; Teixeira, A. A. C.; da Silva, T. G. 2020. Acute and repeated dose 28-day oral toxicity of *Chrysobalanus icaco* L. leaf aqueous extract. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 113, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104643>.
- Reznick, A. Z.; Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymology*, 233, 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)
- Sampaio, B. L.; Edraba-Ebel, R.; da Costa, F. B., 2016. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Sci. Rep.* 6, 29265. <https://doi.org/10.1038/srep29265>.
- Silva, S. N.; Abeu, I. C.; Silva, G. F. C.; Ribeiro, R. M.; Lopes, A. S.; Cartagenes, M. S. S.; Freire, S. M. F.; Borges, A. C. R.; Borges, M. O. R., 2012. The toxicity evaluation of

Syzygium cumini leaves in rodents. Rev. Bras. Farmacogn. 22, 102–108. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000181>.

Sun, M.; Zigman, S. 1978. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. Anal. Biochem. 90, 81-89. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90010-6).

Tanaka, T. 2013. Role of Apoptosis in the Chemoprevention of Cancer. J. Exp. Clin. Med. 5, 89-91. <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2013.04.001>.

Varol, M. 2019. Parietin as an efficient and promising anti-angiogenic and apoptotic small-molecule from *Xanthoria parietina*. Rev. Bras. Farmacogn. 29, 728-734. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.012>.

Vuong, Q. V.; Hirun, S.; Phillips, P. A.; Chuen, T. L. K.; Bowyer, M. C.; Goldsmith, C. D.; Scarlett, C. J. 2014. Fruit-derived phenolic compounds and pancreatic cancer: perspectives from Australian native fruits. J. Ethnopharmacol. 152, 227e242. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.023>.

Zhang, H.; Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Food Sci 8, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Phytochemical analysis of *Richardia brasiliensis* by UHPLC-ESI-HRFTMS

Table S1 - Putative compounds in the hydroethanolic extracts of *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae) by UHPLC-HRFTMS analysis, in positive mode ionization.

Acute oral toxicity

Table S2 - Body and organ weight and relative organ weight (%) after acute oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of CEA in female rats.

Table S3 - Hematological parameters of female rats after oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of the CEA (test) and the vehicle (control).

Table S4 - Biochemical parameters of female rats after acute oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of CEA.

Repeated dose 28-day oral toxicity

Table S5 - Body, organ weight and relative weight (%) after repeated doses (28 days) with the administration of CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg in female and male rats.

Table S6 – Hematological parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Table S7 - Biochemical parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Table S8 – Evaluation of lipid peroxidation and carbonylated proteins in the kidney and liver of female and male rats after 28 days of treatment with CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Table S9 - Evaluation of the enzymatic activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the kidney and liver of female and male rats after 28 days of treatment with CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Phytochemical analysis of *Richardia brasiliensis* by UHPLC-ESI-HRFTMS

Table S1 - Putative compounds in the hydroethanolic extracts of *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae) by UHPLC-HRFTMS analysis, in positive mode ionization.

N°	RT (min)	Putative formula	Exp. <i>m/z</i> [M+H] ⁺ (error)	Compound type	Putative compounds CAS (Reference)	Relative area	
						Aerial Parts	Roots
1	1.98	C ₃ H ₆ N ₂ O ₅	151.0350 (-3.36)	-	n.i.	1.6E8	7.5E7
2	2.12	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₅	317.1139 (0.36)	-	n.i.	3.3E7	3.5E7
3	2.30	C ₁₀ H ₁₉ NO ₇	266.1232 (-3.12)	organic acids	fructose- γ -aminobutyric acid**_10003-63-1 ¹ or 1-deoxy-1-(<i>N</i> - γ -aminobutyric acid)fructose**_CRC: LFG07-I ¹	7.8E7	1.0E8
4	2.40	C ₇ H ₆ O ₃	139.0386 (-6.33)	BAD	salicylic acid_69-72-7 ²	3.00E5	3.90E5
5	2.47	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.0706 (-0.78)	PED or PPD	(+)- α -methoxyphenylacetic acid**_26164-26-1 ³ or (-)- α -methoxyphenylacetic acid**_3966-32-3 ³ or β -phenyllactic acid**_828-01-3 ⁴ or paeonol*_552-41-0 ⁵ or <i>p</i> -hydroxyhydrocinnamic acid*_501-97-3 ⁶	4.30E5	3.00E5
6	2.50	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0504 (1.37)	coumarin or chromone	scopoletin_92-61-5 ⁷ or noreugenin*_1013-69-0 ⁸ or isoscopoletin*_776-86-3 ⁹ or 7-hydroxy-8-methoxycoumarin**_485-90-5 ¹⁰ or 3-methyl-6,8-dihydroxyisocoumarin**_1204-37-1 ¹¹	9.60E5	1.00E6
7	2.50	C ₂₃ H ₁₉ NO ₁₀	470.1077(-2.24)	alkaloids	tuberosinone-N- β -D-glucoside**_81451-88-9 ¹² or isomer	1.60E7	6.90E7

8	2.51	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1039 (2.73)	PPD	5-chlorogenic acid ₃₂₇₋₉₇₋₉ ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid* ₈₇₀₉₉₋₇₆₋₁ ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid* ₈₇₀₉₉₋₇₃₋₈ ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid* ₃₂₇₁₉₋₁₁₋₂ ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid* ₁₅₀₁₆₋₆₀₋₁ ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid* ₉₀₆₋₃₃₋₂ ¹⁴	2.10E5	4.70E5
9	2.58	C ₉ H ₈ O ₃	165.0554 (1.15)	PPD	<i>p</i> -coumaric acid* ₇₄₀₀₋₀₈₋₀ ¹⁴	3.30E6	1.30E6
10	3.19	C ₂₃ H ₁₉ NO ₁₀	470.1084(-0.60)	alkaloids	tuberosinone-N-β-D-glucoside** ₈₁₄₅₁₋₈₈₋₉ ¹² or isomer	2.68E7	4.30E7
11	3.18	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.0703 (-2.87)	PED or PPD	(+)-α-methoxyphenylacetic acid** ₂₆₁₆₄₋₂₆₋₁ ³ or (-)-α-methoxyphenylacetic acid** ₃₉₆₆₋₃₂₋₃ ³ or β-phenyllactic acid** ₈₂₈₋₀₁₋₃ ⁴ or paeonol* ₅₅₂₋₄₁₋₀ ⁵ or <i>p</i> -hydroxyhydrocinnamic acid* ₅₀₁₋₉₇₋₃ ⁶	3.70E5	1.50E5
12	3.21	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	339.1098 (5.23)	PPD	5- <i>O</i> -(<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaroylquinic acid* ₅₇₄₆₋₅₅₋₄ ¹⁴ or 5- <i>O</i> -coumaroylquinic acid* ₈₇₀₉₉₋₇₁₋₆ ¹⁴ or 5- <i>p</i> - <i>cis</i> -coumaroylquinic acid* ₁₈₅₅₀₂₋₆₈₋₅ ¹⁴ or <i>cis</i> -4- <i>O</i> -coumaroylquinic acid* ₉₃₄₃₉₁₋₇₈₋₃ ¹⁴ or 4- <i>O</i> - <i>p</i> - <i>trans</i> -coumaroylquinic acid* ₁₁₀₈₂₀₀₋₇₂₋₁ ¹⁴ or 5- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylquinic acid* ₃₂₄₅₁₋₈₆₋₈ ¹³	1.30E5	2.50E6
13	3.42	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	211.0606 (-0.33)	coumarins	dihydrocoumarin deriv. ₁₁₇₅₈₆₃₋₂₄₋₇ ¹⁵	6.00E5	5.00E5
14	3.43	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1030 (0.16)	PPD	5-chlorogenic acid ₃₂₇₋₉₇₋₉ ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid* ₈₇₀₉₉₋₇₆₋₁ ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid* ₈₇₀₉₉₋₇₃₋₈ ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid* ₃₂₇₁₉₋₁₁₋₂ ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid* ₁₅₀₁₆₋₆₀₋₁ ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid* ₉₀₆₋₃₃₋₂ ¹⁴	2.30E5	1.80E5
15	3.45	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0505 (1.94)	coumarins or chromones	scopoletin ₉₂₋₆₁₋₅ ⁷ or noreugenin* ₁₀₁₃₋₆₉₋₀ ⁸ or isoscapoletin* ₇₇₆₋₈₆₋₃ ⁹ or 7-hydroxy-8-methoxycoumarin** ₄₈₅₋₉₀₋₅ ¹⁰ or 3-Methyl-6,8-dihydroxyisocoumarin** ₁₂₀₄₋₃₇₋₁ ¹¹	1.30E6	5.10E5
16	3.68	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.0703 (-2.69)	PED or PPD	(+)-α-methoxyphenylacetic acid** ₂₆₁₆₄₋₂₆₋₁ ³ or (-)-α-methoxyphenylacetic acid** ₃₉₆₆₋₃₂₋₃ ³ or β-phenyllactic acid** ₈₂₈₋₀₁₋₃ ⁴ or paeonol* ₅₅₂₋₄₁₋₀ ⁵ or <i>p</i> -hydroxyhydrocinnamic acid* ₅₀₁₋₉₇₋₃ ⁶	8.10E5	2.30E5

17	3.68	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	197.0813 (-0.43)	PPD	shorbic acid*_1135-23-5 ¹⁴	2.20E6	1.80E6
18	3.68	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	215.0909 (-4.88)	iridoids	borreriagenin_249916-07-2 ¹⁶	2.80E5	2.00E5
19	4.56	C ₉ H ₈ O ₄	181.0487 (-7.60)	PPD	caffeic acid*_331-39-5 ¹⁷	8.10E5	2.70E5
20	4.81	-	195.1220	-	n.i.	5.50E7	5.30E7
21	5.06	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1035 (1.74)	PPD	5-chlorogenic acid_327-97-9 ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_87099-76-1 ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid*_87099-73-8 ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid*_32719-11-2 ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_15016-60-1 ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_906-33-2 ¹⁴	7.80E5	1.10E5
22	5.06	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0864(-2.25)	amino acids	<i>L</i> -phenylalanine*_63-91-2 ¹⁸	1.30E8	1.50E7
23	5.16	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.0709 (0.78)	PED or PPD	(+)- α -methoxyphenylacetic acid**_26164-26-1 ³ or (-)- α -methoxyphenylacetic acid**_3966-32-3 ³ or β -phenyllactic acid**_828-01-3 ⁴ or paeonol*_552-41-0 ⁵ or <i>p</i> -hydroxyhydrocinnamic acid*_501-97-3 ⁶	6.50E5	2.60E5
24	5.47	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0505 (1.94)	coumarins or chromones	scopoletin_92-61-5 ⁷ or noreugenin*_1013-69-0 ⁸ or isoscooletin*_776-86-3 ⁹ or 7-hydroxy-8-methoxycoumarin**_485-90-5 ¹⁰ or 3-methyl-6,8-dihydroxyisocoumarin**_1204-37-1 ¹¹	1.00E5	5.70E5
25	5.50	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	225.0762 (-0.31)	iridoids	garjasmin*_144868-43-9 ¹⁹	5.00E5	3.50E6
26	5.51	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1045 (4.28)	PPD	5-chlorogenic acid_327-97-9 ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_87099-76-1 ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid*_87099-73-8 ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid*_32719-11-2 ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_15016-60-1 ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_906-33-2 ¹⁴	1.10E6	5.10E5
27	5.93	C ₁₈ H ₂₇ NO ₁₂	450.1601 (-2.27)	-	n.i.	3.00E7	1.60E8

28	5.93	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0498 (-1.37)	coumarins or chromones	scopoletin_92-61-5 ⁷ or noreugenin*_1013-69-0 ⁸ or isoscapoletin*_776-86-3 ⁹ or 7-hydroxy-8-methoxycoumarin**_485-90-5 ¹⁰ or 3-methyl-6,8-dihydroxyisocoumarin**_1204-37-1 ¹¹	7.10E5	3.00E6
29	6.19	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	265.1545 (-2.67)	-	n.i.	2.46E8	3.55E7
30	6.38	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0504 (1.37)	coumarins or chromones	scopoletin_92-61-5 ⁷ or noreugenin*_1013-69-0 ⁸ or isoscapoletin*_776-86-3 ⁹ or 7-hydroxy-8-methoxycoumarin**_485-90-5 ¹⁰ or 3-methyl-6,8-dihydroxyisocoumarin**_1204-37-1 ¹¹	7.20E4	3.50E5
31	6.40	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1012 (-4.79)	PPD	5-chlorogenic acid_327-97-9 ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_87099-76-1 ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid*_87099-73-8 ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid*_32719-11-2 ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_15016-60-1 ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_906-33-2 ¹⁴	1.30E6	4.50E5
32	6.43	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.0708 (0.18)	PED or PPD	(+)- α -methoxyphenylacetic acid**_26164-26-1 ³ or (-)- α -methoxyphenylacetic acid**_3966-32-3 ³ or β -phenyllactic acid**_828-01-3 ⁴ or paeonol*_552-41-0 ⁵ or <i>p</i> -hydroxyhydrocinnamic acid*_501-97-3 ⁶	5.10E5	5.60E5
33	6.79	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	209.1535 (-3.13)	-	n.i.	1.40E7	1.23E7
34	7.07	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1022 (-2.00)	PPD	5-chlorogenic acid_327-97-9 ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_87099-76-1 ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid*_87099-73-8 ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid*_32719-11-2 ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_15016-60-1 ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_906-33-2 ¹⁴	9.70E4	8.00E4
35	7.21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1015 (-3.82)	flavonoids	spireoside*_20229-56-5 ²⁰ or hirsutrin*_482-35-9 ¹⁴ or hyperin*_482-36-0 ¹⁴	2.50E5	0
36	7.53	C ₈ H ₈ O ₄	169.0499 (-1.21)	quinones or BAD	2,5-dimethoxy- <i>p</i> -benzoquinone*_3117-03-1 ²¹ or methyl protocatechuate*_2150-43-8 ²² or vanillic acid_121-34-6 ⁷	3.30E5	7.20E5
37	7.60	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1675 (1.84)	flavonoids	nicotiflorin*_17650-84-9 ²³ or kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -ramnoside*_2392-95-2 ¹³ or kaempferol 3- <i>O</i> -robinobioside*_17297-56-2 ¹³ or quercetin 3,7-dirhamnoside*_28638-13-3 ²³	1.40E6	6.30E4

38	7.67	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1119 (-3.68)	flavonoids	kaempferol 7-rhamnoside*_20196-89-8 ¹³	1.50E5	2.90E4
39	7.67	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	757.2158 (-4.36)	flavonoids	flavonoid*_1622261-04-4 ¹³	6.40E6	2.10E5
40	7.74	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1013 (-4.56)	PPD	5-chlorogenic acid_327-97-9 ¹³ or cis-4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_87099-76-1 ¹⁴ or trans-4-caffeoylquinic acid*_87099-73-8 ¹⁴ or (<i>Z</i>)-neochlorogenic acid*_32719-11-2 ¹⁴ or 3-cis- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_15016-60-1 ¹⁴ or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_906-33-2 ¹⁴	4.60E5	3.20E5
41	7.77	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0508 (0.96)	flavonoids	quercetin_117-39-5 ¹³	2.00E6	6.70E5
42	7.77	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1614 (0.24)	flavonoids	rutin*_153-18-4 ²³ or 3- <i>O</i> -rhamnosyl-7- <i>O</i> -glucosyl-quercetin*_17306-45-5 ¹³	1.20E7	4.60E6
43	7.81	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1011 (-4.81)	flavonoids	spireoside*_20229-56-5 ²⁰ or hirsutrin*_482-35-9 ¹⁴ or hyperin*_482-36-0 ¹⁴	9.90E5	4.00E5
44	7.99	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.0708 (-0.18)	PED or PPD	(+)- α -methoxyphenylacetic acid**_26164-26-1 ³ or (-)- α -methoxyphenylacetic acid**_3966-32-3 ³ or β -phenyllactic acid**_828-01-3 ⁴ or paeonol*_552-41-0 ⁵ or <i>p</i> -hydroxyhydrocinnamic acid*_501-97-3 ⁶	4.20E5	1.70E5
45	8.09	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581.1483 (-4.01)	flavonoids	3- <i>O</i> - β -xylopyranosylquercetin 7- <i>O</i> - α -rhamnopyranoside*_102733-91-5 ¹³	1.20E6	4.90E4
46	8.16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1012 (-4.59)	flavonoids	spireoside*_20229-56-5 ²⁰ or hirsutrin*_482-35-9 ¹⁴ or hyperin*_482-36-0 ¹⁴	1.10E6	9.40E4
47	8.16	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	369.1167 (-4.95)	PPD	3-feruloylquinic acid*_1899-29-2 ¹⁴ or 5- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloylquinic acid*_62929-69-5 ¹⁴ or trans-5- <i>O</i> -feruloyl quinic acid*_87099-72-7 ¹⁴ or PPD*_87099-75-0 ¹⁴ or PPD*_89886-27-1 ¹⁴ or PPD*_96646-16-1 ¹⁴ or 3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid methyl ester*_123483-19-2 ¹⁴ or PPD*_1227161-38-7 ¹⁴ or methyl 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_29708-87-1 ¹⁴	6.30E5	4.40E5
48	8.27	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1085 (0.16)	flavonoids	quercitrin*_522-12-3 ²⁴ or astragalins*_480-10-4 ¹³ or vincetoxicoside B*_22007-72-3 ¹³ or trifolin*_23627-87-4 ²⁵	9.00E5	4.70E4
49	8.27	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1665 (0.32)	flavonoids	nicotiflorin*_17650-84-9 ²³ or kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside*_2392-95-2 ¹³ or kaempferol 3- <i>O</i> -robinobioside*_17297-56-2 ¹³ or quercetin 3,7-dirhamnoside*_28638-13-3 ²³	8.20E6	4.80E5

50	8.34	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.1736 (-5.14)	flavonoids	narcissin_604-80-8 ⁷	1.70E7	5.20E5
51	8.47	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.1331 (-2.87)	PPD	1,5-dicaffeoylquinic acid*_30964-13-7 ¹⁴ or PPD*_89886-28-2 ¹⁴ or 4,5-di- <i>O</i> -(E)-caffeoylquinic acid*_89886-31-7 ¹⁴ or PPD*_89919-61-9 ¹⁴ or 3,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*_89919-62-0 ¹⁴ or 4,5-dicaffeoylquinic acid*_89886-30-6 ²⁶	4.70E4	1.20E5
52	8.69	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.0650 (-3.97)	PPD or coumarins	ferulic acid*_1135-24-6 ¹⁴ or (3R)-7,8-Dihydroxy-3-methyl-3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-1-one*_76944-38-2 ¹⁵	2.10E6	2.20E5
53	8.69	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1083 (-0.29)	flavonoids	quercitrin*_522-12-3 ²⁴ or astragalin*_480-10-4 ¹³ or vincetoxicoside B*_22007-72-3 ¹³ or trifolin*_23627-87-4 ²⁵	1.80E6	7.00E4
54	8.86	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0504 (1.79)	coumarins or chromones	scopoletin_92-61-5 ⁷ or noreugenin*_1013-69-0 ⁸ or isoscopoletin*_776-86-3 ⁹ or 7-hydroxy-8-methoxycoumarin**_485-90-5 ¹⁰ or 3-methyl-6,8-dihydroxyisocoumarin**_1204-37-1 ¹¹	1.40E6	1.30E6
55	9.08	C ₈ H ₈ O ₄	169.0509 (4.76)	quinones or BAD	2,5-dimethoxy- <i>p</i> -benzoquinone*_3117-03-1 ²¹ or methyl protocatechuate*_2150-43-8 ²² or vanillic acid_121-34-6 ⁷	9.80E4	7.30E4
56	9.75	C ₁₅ H ₂₄ O	221.1901 (-1.89)	sesquiterpenes	decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-1H-cycloprop[e]azulen-7-ol**_72203-24-8 ²⁷	7.40E5	3.90E4
57	11.51	C ₂₀ H ₁₇ N	272.1431(-2.92)	-	n.i.	7.60E7	8.97E6
58	11.61	C ₉ H ₆ O ₃	163.0390 (-3.19)	coumarins	7-hydroxycoumarin*_93-35-6 ²⁸	6.10E6	4.00E5
59	12.11	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0555 (-0.09)	flavonoids	kaempferol*_520-18-3 ¹⁹ or luteolin*_491-70-3 ¹⁹	1.00E7	2.20E5
60	12.14	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	245.0812 (-0.59)	coumarins	norbraylin**_60796-64-7 ²⁹	1.60E6	5.30E6
61	12.18	C ₂₂ H ₁₈ N ₂	311.1533 (-4.93)	-	n.i.	1.20E7	1.98E6
62	12.78	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0867 (-0.57)	catechins	(-)-epicatechin*_490-46-0 ³⁰ or (+)-catechin*_154-23-4 ³⁰	3.20E5	6.10E4
63	13.23	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	275.0910 (-3.56)	-	caesappin B**_1622209-05-5 ³¹ or others 291 hits on DNP	2.70E7	4.92E7

64	13.33	C ₁₉ H ₂₃ NO ₆	362.1591(-3.41)	alkaloids	crinafolidine**_106549-07-9 ³² or others 19 hits on DNP	2.70E7	1.90E7
65	13.65	C ₁₂ H ₁₇ NO	192.1384 (-2.23)	alkaloids	rupestine L**_1404307-81-8 ³³ or others 17 hits on DNP	1.40E7	1.80E7
66	13.90	C ₁₇ H ₁₃ NO ₃	280.0969(-1.42)	alkaloids	graveoline**_485-61-0 ³⁴ or others 26 hits on DNP	4.20E7	4.00E7
67	14.45	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	274.2737(-3.15)	-	<i>N</i> -dodecyl diethanolamine**_1541-67-9 ³⁵ or isomer	3.40E7	1.10E8
68	14.53	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.1122 (-1.70)	coumarins	cedrelopsin**_19397-28-5 ³⁶ or isocedrelopsin**_741261-06-3 ³⁶ or 3',4'-dihydrobraylin_4221-60-7 ³⁶	9.20E6	1.40E7
69	15.10	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	453.3347 (-4.79)	triterpene	kadcoccine acid G**_2022944-07-4 ³⁷ or others 101 hits on DNP	4.96E7	7.91E7
70	15.62	C ₂₈ H ₄₄ O ₅	461.3281 (2.95)	chromanes	litchtocotrienol B**_1665284-93-4 ³⁸ or others 66 hits on DNP	3.50E7	2.10E7
71	15.97	C ₂₈ H ₄₄ O ₅	461.3282 (3.23)	chromanes	litchtocotrienol B**_1665284-93-4 ³⁸ or others 66 hits on DNP	1.50E8	6.70E7
72	15.98	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	316.2839 (-3.95)	alkaloids	prospine**_14058-38-9 ³⁹ or others 38 hits on DNP	5.11E8	2.30E8
73	16.39	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	298.2732 (-4.64)	-	n.i.	9.18E7	1.53E8
74	17.28	C ₁₉ H ₃₇ NO ₃	328.2839 (-3.71)	-	n.i.	7.48E7	4.27E7
75	17.52	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	277.2159 (-3.16)	terpenes	metaglyptin I**_212331-28-7 ⁴⁰ or others 57 hits on DNP	1.49E8	4.08E7
76	18.37	-	330.2981	-	n.i.	1.14E8	3.87E7
77	20.58	-	284.3302	-	n.i.	7.50E7	9.40E7
78	21.49	-	324.2878	-	n.i.	6.90E7	3.30E7

79	21.91	C ₂₄ H ₄₁ NO ₃	392.3155(-2.37)	-	palvanil**_69693-13-6 ⁴¹ or dindygulerinone A**_1425163-49-0 ⁴² or isomer	2.00E7	1.59E8
80	22.02	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₅	607.2528	-	n.i.	2.90E7	1.52E6
81	22.27	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.2636 (-0.31)	fatty acids	ethyl linolenate*_1191-41-9 ⁴³	8.10E6	1.60E7
82	22.40	C ₂₄ H ₄₁ NO ₃	392.3171 (1.48)	-	palvanil**_69693-13-6 ⁴¹ or dindygulerinone A**_1425163-49-0 ⁴² or isomer	5.21E6	3.78E7
83	22.72	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	323.2579 (-2.23)	diterpenes	kauranetriol**_1678-33-7 ⁴⁴ or others 730 hits on DNP	3.50E7	1.80E8
84	22.86	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	323.2593 (2.04)	diterpenes	kauranetriol**_1678-33-7 ⁴⁴ or others 730 hits on DNP	1.31E8	1.80E8
85	23.00	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	323.2579 (-2.17)	diterpenes	kauranetriol**_1678-33-7 ⁴⁴ or others 730 hits on DNP	8.70E7	8.20E7
86	23.00	-	625.2993	-	n.i.	1.50E8	4.39E6
87	23.21	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	439.3557 (-4.24)	triterpenes	11 α ,12 α -oxidotaraxerone**_2118-73-2 ⁴⁵ or others 126 hits on DNP	3.00E7	1.37E7
88	23.21	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	457.3673 (-1.81)	triterpenes	oleanolic acid_508-02-1 ⁷ or <i>epi</i> -betulinic acid*_38736-77-5 ⁴⁶ or ursolic acid*_77-52-1 ⁴⁶ or betulinic acid*_472-15-1 ⁴⁶	1.00E7	1.30E6
89	23.32	C ₂₇ H ₄₄ O ₁₅	609.2743 (-2.58)	iridoids	diglycoside iridoid**_2359682-56-5 ⁴⁷ or isomer	5.70E7	4.63E6
90	23.42	C ₂₄ H ₄₁ NO ₃	392.3154 (-2.72)	-	palvanil**_69693-13-6 ⁴¹ or dindygulerinone A**_1425163-49-0 ⁴² or isomer	2.57E7	1.99E8
91	23.46	-	625.2645	-	n.i.	1.51E8	3.69E6
92	23.70	-	545.4441	-	n.i.	3.44E7	3.10E7
93	23.84	C ₂₇ H ₄₄ O ₁₅	609.2746 (-2.00)	iridoids	diglycoside iridoid**_2359682-56-5 ⁴⁷ or isomer	6.30E7	4.29E6

94	23.98	-	639.2795	-	n.i.	4.02E7	5.43E5
95	24.02	C ₂₄ H ₄₁ NO ₃	392.3171 (1.56)	-	palvanil**_69693-13-6 ⁴¹ or dindygulerinone A**_1425163-49-0 ⁴² or isomer	7.97E6	4.53E7
96	24.27	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₂	595.2771 (2.78)	taxanes	1-hydroxy-5-decinnamoyltaxinine J**_161956-27-0 ⁴⁸ or others 27 hits on DNP	7.70E8	3.10E7
97	24.27	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₁₁	593.2709 (-0.10)	alkaloids	gardmutine C**_CRC: RQK43-X ⁴⁹ or isomer	2.02E9	7.53E7
98	24.48	C ₂₇ H ₄₄ O ₁₅	609.2743 (-2.56)	iridoids	diglycoside iridoid**_2359682-56-5 ⁴⁷ or isomer	8.00E7	6.77E5
99	24.59	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₀	635.2828 (-4.37)	limonoids	1-O-detigloyl-1-O-benzoylohchinolal**_768396-28-7 ⁵⁰ or others 12 hits on DNP	1.60E8	7.86E6
100	24.86	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₁₁	593.2716 (0.96)	alkaloids	gardmutine C**_CRC: RQK43-X ⁴⁹ or isomer	3.44E8	5.22E5
101	24.86	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₂	595.2742 (-2.19)	taxanes	1-hydroxy-5-decinnamoyltaxinine J**_161956-27-0 ⁴⁸ or others 27 hits on DNP	1.40E8	1.00E7
102	24.86	C ₂₇ H ₄₅ NO ₁₄	608.2916 (-0.42)	-	n.i.	1.05E8	5.35E5
103	26.20	C ₃₆ H ₄₄ O ₁₁	653.2932 (-4.58)	limonoids	moluccensin H**_1210345-90-6 ⁵¹ or others 7 hits on DNP	3.70E8	9.63E6
104	26.33	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	393.3011 (1.61)	diterpenes	15,18-acetoxy-3-ene- <i>cis</i> -clerodane**_502188-17-2 ⁵² or others 67 hits on DNP	3.79E7	1.65E5
105	26.37	C ₃₆ H ₄₄ O ₁₀	637.3003 (-1.51)	terpenes	dichrostachine G**_1189060-95-4 ⁵³ or celaglaumin**_126770-34-1 ⁵⁴ or β-dihydroagarofuran**_138797-52-1 ⁵⁵ or peditithin H**_1951436-26-2 ⁵⁶	1.02E7	2.09E7
106	27.31	-	621.3032	-	n.i.	1.48E9	8.26E7
107	27.42	C ₂₉ H ₄₈ O ₁₅	637.3042 (-4.58)	terpenes	dichrostachine G**_1189060-95-4 ⁵³ or celaglaumin**_126770-34-1 ⁵⁴ or β-dihydroagarofuran**_138797-52-1 ⁵⁵ or peditithin H**_1951436-26-2 ⁵⁶	5.55E7	2.27E6

108	27.87	C ₂₉ H ₄₈ O ₁₅	637.3003 (-1.56)	terpenes	dichrostachine G ^{**} _1189060-95-4 ⁵³ or celaglaumin ^{**} _126770-34-1 ⁵⁴ or β-dihydroagarofuran ^{**} _138797-52-1 ⁵⁵ or peditithin H ^{**} _1951436-26-2 ⁵⁶	2.37E7	9.57E5
109	28.01	-	621.3032	-	n.i.	2.88E8	1.32E7

Note: (*) not identified in *Richardia brasiliensis*, but described for Rubiaceae. (**) not described for Rubiaceae; (BAD) benzoic acid derivative; (PED) phenylethanoid derivative; (PPD) phenylpropanoid derivative.

References

1. Betweek, I. R., Acids, A. & Apricots, F. Chemistry of non-enzymic browning. I. Reactions between amino acids, organic acids, and sugars in freeze-dried apricots and peaches. *Aust. J. Chem.* 10, 182–192 (1956).
2. De Tomaz, A. C. A. *et al.* Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). *Brazilian J. Pharmacogn.* 18, 47–52 (2008).
3. Gubiani, J. R. *et al.* Rearranged Sesquiterpenes and branched polyketides produced by the endophyte *Camarops* sp. *Phytochem. Lett.* 17, 251–257 (2016).
4. Gubiani, J. R. *et al.* One strain-many compounds (OSMAC) method for production of phenolic compounds using *Camarops* sp., An endophytic fungus from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). *Quim. Nova* 39, 1221–1224 (2016).
5. Kang, W., Li, G. & Hao, X. Two new triterpenes from *Neonauclea sessilifolia*. *Acta Bot. Sin.* 45, 1003–1007 (2003).
6. Camero, C. M. *et al.* Anti-angiogenic activity of iridoids from *Galium tunetanum*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 28, 374–377 (2018).
7. Pinto, D. S. *et al.* Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). *Brazilian J. Pharmacogn.* 18, 367–372 (2008).
8. Schlittler, E. & Spitaler, U. On the contents of *Schumanniohyton problematicum* (Rubiaceae). *Tetrahedron Lett.* 1, 2911–2914 (1978).
9. Li, B., Zhang, D. & Luo, Y. Chemical constituents from root of *Lasianthus acuminatissimus* I. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 31, 133–135 (2006).
10. Yu, Y., Song, Y., Liu, L., Sun, Q. & Zhou, H. Chemical constituents from *Nannoglottis yuennanensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 80, 91–93 (2018).
11. Gallo, M. B. C. *et al.* Chemical constituents of *Papulaspora immersa*, an endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and their cytotoxic activity. *Chem. Biodivers.* 7, 2941–2950 (2010).

12. Li, H. *et al.* Constituents of *Aristolochia cinnabarina*. *Zhiwu Xuebao* 37, 745–748 (1995).
13. Jaiswal, R. *et al.* Identification and characterisation of phenolics from *Ixora coccinea* L. (Rubiaceae) by liquid chromatography multi-stage mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 25, 567–576 (2014).
14. Jaiswal, R. *et al.* Identification and characterization of hydroxycinnamates of Six *Galium* species from the Rubiaceae family. in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 1–20 (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
15. Oliveira, C. M. *et al.* Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. *Phytochem. Lett.* 4, 93–96 (2011).
16. Rasoarivelo, T. S.R. *et al.* Chemical study of *Anthospermum emirnense* (Rubiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 70, 186–191 (2017).
17. Candida da Silva, V. *et al.* A new ent-kaurane diterpene from stems of *Alibertia macrophylla* K. Schum. (Rubiaceae). *Helv. Chim. Acta* 90, 1781–1785 (2007).
18. Cheek, M. *et al.* *Kupeantha* (Coffeeae, Rubiaceae), a new genus from Cameroon and Equatorial Guinea. *PLoS One* 13, 1–22 (2018).
19. Mohammed, A. M. A. *et al.* Garjasmine unequivocally isolated from the Rubiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 44, 109–111 (2012).
20. Karna, K. K. *et al.* The ameliorative effect of monotropein, astragalol, and spiraeoside on oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial signaling pathway in varicocelized rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 1–13 (2019).
21. Huu, B. C. & Phung, N. K. P. Contribution to the study on chemical constituents of *Hedyotis crassifolia* L., (Rubiaceae). *J. Chem.* 45, 363–367 (2007).
22. Dao, P. T. A., Quan, T. Le & Mai, N. T. T. Constituents of the stem of *Nauclea orientalis*. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1901–1903 (2015).
23. Berger, A. *et al.* New reports on flavonoids, benzoic- and chlorogenic acids as rare features in the *Psychotria alliance* (Rubiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 66, 145–153 (2016).
24. Ferreira Júnior, J. C., Lyra Lemos, R. P. & Conserva, L. M. Chemical constituents from *Spermacoce verticillata* (Rubiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 44, 208–211 (2012).
25. Khwanchuea, R. *et al.* Saponins from Fresh Fruits of *Randia siamensis* (Lour) Roem. & Schult. (Rubiaceae). *Nat. Prod. Commun.* 3, 163–170 (2008).
26. Batista, J. C. *et al.* Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). *Quim. Nova* 37, 638–642 (2014).
27. Bowyer, R. C. & Jefferies, P. R. Structure of spathulenol. *Chem. Ind. (London, United Kingdom)* 1, 1245–1246 (1963).
28. Lima, O. A. & Polonsky, J. Flavonoid constituents of *Cephalanthus spathelliferus*. *Phytochemistry* 12, 913–916 (1973).
29. Mulholland, D. A. *et al.* Coumarins from *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochemistry* 61, 919–922 (2002).
30. Soobrattee, M. A. *et al.* Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicol. Vit.* 22, 45–56 (2008).
31. Wang, Z. *et al.* Caesappin A and B, two novel protosappanins from *Caesalpinia sappan* L. *Fitoterapia* 92, 280–284 (2014).
32. Ghosal, S. & Singh, S. K. Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 24. Crinafoline and crinafolidine, two antitumor alkaloids from

- Crinum latifolium*. *J. Journal Chem. Res. Synopses* 312–313 (1986).
33. He, F. *et al.* Rupestines F - M, new guaipyridine sesquiterpene alkaloids from *Artemisia rupestris*. *Chem. Pharm. Bull.* 60, 213–218 (2012).
 34. Ghosh, S., Bishayee, K. & Khuda-Bukhsh, A. R. Graveoline isolated from ethanolic extract of *Ruta graveolens* triggers apoptosis and autophagy in skin melanoma cells: A novel apoptosis-independent autophagic signaling pathway. *Phyther. Res.* 28, 1153–1162 (2014).
 35. Brown, L. S. R. & Gray, D. O. Diethanolamine, a secondary amine from the Compositae. *J. Nat. Prduct* 49, 910–912 (1986).
 36. Um, B. H. *et al.* New coumarins from *Cedrelopsis grevei*. *Fitoterapia* 74, 638–642 (2003).
 37. Hu, Z. X. *et al.* Rearranged 6/6/5/6-fused triterpenoid acids from the stems of *Kadsura coccinea*. *J. Nat. Prod.* 79, 2590–2598 (2016).
 38. Lin, Y. C. *et al.* New bioactive chromanes from *Litchi chinensis*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2472–2478 (2015).
 39. Khuong-Huu, Q. *et al.* Alcaloides piperidiniques. II. structures de la prosopine et de la prosopinine, alcaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub. *Bull. Soc. Chim. Belges* 81, 425–442 (1972).
 40. Tu, W. C. *et al.* Diterpenoids and sesquiterpenoids from the stem bark of *Metasequoia glyptostroboides*. *Phytochemistry* 161, 86–96 (2019).
 41. Kobata, K. *et al.* Long-chain N-vanillyl-acylamides from *Capsicum oleoresin*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3627–3631 (2010).
 42. Wang, X. Z., Qu, W. & Liang, J. Y. Two N-containing polyketide derivatives from *Peperomia dindygulensis*. *Chem. Nat. Compd.* 48, 1027–1030 (2013).
 43. Prabhu, T.P. *et al.* GC-MS analysis of ethanolic extract of *Canthium parviflorum* lamk leaf. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3, 166–168 (2013).
 44. Baddeley, G. V. *et al.* Chemistry of the Euphorbiaceae. Diterpenes from a *Beyeria* sp. *Aust. J. Chem.* 17, 578–586 (1964).
 45. Hu, J. *et al.* Cytotoxic taraxerane triterpenoids from *Saussurea graminea*. *Fitoterapia* 83, 55–59 (2012).
 46. Zhang, T. T. *et al.* Chemical constituents from stems of *Hedyotis hedyotide* and their immunosuppressive activity. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 40, 2357–2362 (2015).
 47. Tomassini, L. *et al.* A new iridoid diglycoside from *Sambucus ebulus* L. *Nat. Prod. Res.* 1–7 (2019).
 48. Tong, X. J., Liu, Y. C. & Chang, C. J. Taxanes From *Taxus*. X. Media Hicksii. *Nat. Prod. Lett.* 6, 197–202 (1995).
 49. Sakai, S. I. *et al.* Gardneria Alkaloids. XI. Several minor bases of *Gardneria multiflora*. Makino. *YAKUGAKU ZASSHI* 97, 399–409 (1977).
 50. Diaz, M. *et al.* Limonoids from *Melia azedarach* with deterrent activity against insects. *Nat. Prod. J.* 2, 36–44 (2012).
 51. Wu, J. *et al.* Limonoids and tirucallane derivatives from the seeds of a *Krishna mangrove*, *xylocarpus moluccensis*. *J. Nat. Prod.* 73, 644–649 (2010).
 52. Kalpoutzakis, E. *et al.* Cis-clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *J. Nat. Prod.* 66, 316–319 (2003).
 53. Long, C. *et al.* Meroterpenes from *Dichrostachys cinerea* inhibit protein farnesyl transferase activity. *J. Nat. Prod.* 72, 1804–1815 (2009).
 54. Ying, Y. M. *et al.* Chemical constituents of *Celastrus rugosus*. *Chem. Nat. Compd.* 53, 589–591 (2017).
 55. Qiang, T. Y. *et al.* Two new sesquiterpenoids from *Celastrus rosthornianus*. *J. Nat. Prod.* 55, 126–128 (1992).
 56. Zhu, J. *et al.* Jatrophone diterpenoids as modulators of p-glycoprotein-dependent multidrug resistance (MDR): Advances of structure-activity relationships and discovery of promising MDR reversal agents. *J. Med. Chem.* 59, 6353–6369 (2016).

Acute oral toxicity

Table S2 - Body and organ weight and relative organ weight (%) after acute oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of CEA in female rats.

Parameters	Groups	
	Control	2000 mg/kg
Initial body weight (g)	120.00 ± 5.21	125.8 ± 6.22
Final body weight (g)	151.31 ± 1.65	156.38 ± 1.46
Liver weight (g)	6.65 ± 0.70	6.56 ± 1.71
Kidney weight (g)	1.66 ± 0.13	1.64 ± 0.07
Spleen weight (g)	0.54 ± 0.06	0.55 ± 0.06
Relative weight of organs (%)		
Liver weight (%)	4.39 ± 0.39	4.13 ± 0.97
Kidney weight (%)	1.09 ± 0.07	1.05 ± 0.05
Spleen weight (%)	0.36 ± 0.05	0.35 ± 0.05

Results are expressed as mean ± SD. Values were significantly different when $p < 0.05$. No differences were observed.

Table S3 - Hematological parameters of female rats after oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of the CEA (test) and the vehicle (control).

Parameters	Groups	
	Control	2000 mg/kg
RCB ($10^6/\mu\text{L}$)	6.96 ± 0.23	6.94 ± 0.18
HGB (g/dL)	13.52 ± 0.76	13.80 ± 0.72
HCT (%)	44.16 ± 1.67	44.88 ± 4.31
MCV (fL)	63.48 ± 1.76	64.7 ± 6.15
CHCM (g/dL)	30.54 ± 1.00	30.84 ± 1.97
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1.015 ± 353.99	765.40 ± 413.12
PPT (mg/dL)	6.16 ± 0.35	5.76 ± 0.57
Total leukocytes (μL)	4.24 ± 1.99	3.76 ± 1.94
Band cells (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Neutrophils (%)	10.00 ± 6.26	11.00 ± 3.39
Lymphocytes (%)	72.33 ± 35.70	86.40 ± 4.39
Monocytes (%)	0.00 ± 0.00	1.40 ± 1.34*
Eosinophils (%)	1.00 ± 1.09	1.20 ± 0.83

Basophiles (%) 0.00 ± 0.00 0.00 ± 0.00

Results are expressed as mean \pm SD. Values were significantly different when $p < 0.05$. *Compared with the control group. Total red blood cells (RBC); Hemoglobin (HGB); Hematocrit (HCT); Mean corpuscular volume (MVC); Mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM); Platelets (PLT); Total plasma proteins (PPT).

Table S4 - Biochemical parameters of female rats after acute oral treatment with the administration of 2000 mg/kg of CEA.

Parameters	Groups	
	Control	2000 mg/kg
ALP (U/L)	287.00 ± 47.30	270.80 ± 49.39
ALT (U/L)	33.4 ± 10.99	32.0 ± 9.03
AST (U/L)	89.75 ± 17.40	110.80 ± 25.60
CHOL (mg/dL)	66.60 ± 4.92	67.20 ± 13.02
TP (mg/dL)	5.32 ± 1.39	4.63 ± 1.11
CRE (mg/dL)	0.62 ± 0.13	0.56 ± 0.12
Urea (mg/dL)	47.60 ± 8.79	45.33 ± 12.16

Results are expressed as mean \pm SD. Values were significantly different when $p < 0.05$. *Compared with the control group. Alkaline phosphatase (ALP); Alanine aminotransferase (ALT); Aspartate aminotransferase (AST); Cholesterol (CHOL); Total serum protein (TP); Creatinine (CRE).

Repeated dose 28-day oral toxicity

Table S5 - Body, organ weight and relative weight (%) after repeated doses (28 days) with the administration of CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg in female and male rats.

Parameters	Groups			
	Control	200 mg/Kg	400 mg/Kg	600 mg/Kg
Female				
Initial body weight (g)	161.40 ± 14.99	150.00 ± 10.34	144.40 ± 4.87	160.60 ± 14.04
Final body weight (g)	208.15 ± 2.69	193.68 ± 2.18	192.30 ± 1.77	205.31 ± 2.20
Liver weight (g)	4.88 ± 0.72	4.73 ± 1.19	4.81 ± 0.78	4.31 ± 0.91
Kidney weight (g)	0.99 ± 0.19	0.87 ± 0.18	0.92 ± 0.10	0.96 ± 0.13
Spleen weight (g)	0.38 ± 0.10	0.27 ± 0.08	0.36 ± 0.08	0.28 ± 0.07
Heart weight (g)	0.59 ± 0.17	0.48 ± 0.20	0.43 ± 0.1	0.52 ± 0.15
Relative weight of organs				
Liver weight (%)	2.34 ± 0.31	2.44 ± 0.59	2.50 ± 0.40	2.11 ± 0.50

Kidney weight (%)	0.48 ± 0.11	0.45 ± 0.10	0.47 ± 0.05	0.46 ± 0.05
Spleen weight (%)	0.18 ± 0.05	0.14 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.14 ± 0.04
Heart weight (%)	0.28 ± 0.08	0.24 ± 0.10	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.06
Male				
Initial body weight (g)	153.8 ± 9.36	158.4 ± 3.64	154.4 ± 1.51	146.4 ± 5.22 ^b
Final body weight (g)	236.32 ± 2.97	234.52 ± 12.53	237.69 ± 2.91	220.23 ± 1.40
Liver weight (g)	8.75 ± 0.66	9.15 ± 0.87	8.87 ± 1.21	7.47 ± 1.18
Kidney weight (g)	1.75 ± 0.27	1.81 ± 0.15	1.87 ± 0.26	1.63 ± 0.18
Spleen weight (g)	0.55 ± 0.04	0.64 ± 0.05 ^c	0.63 ± 0.07 ^c	0.46 ± 0.05
Heart weight (g)	0.81 ± 0.06	0.77 ± 0.11	0.88 ± 0.19	0.71 ± 0.13
Relative weight of organs				
Liver weight (%)	3.71 ± 0.35	3.95 ± 0.70	3.72 ± 0.42	3.38 ± 0.38
Kidney weight (%)	0.74 ± 0.10	0.77 ± 0.08	0.78 ± 0.09	0.74 ± 0.09
Spleen weight (%)	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.03 ^c	0.26 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.02
Heart weight (%)	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.37 ± 0.07	0.32 ± 0.05

Results are expressed as mean ± SD. Values were significantly different when $p < 0.05$.

Table S6 – Hematological parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Parameters	Groups			
	Control	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
Female				
RCB ($10^6/\mu\text{L}$)	7.79 ± 0.44	7.87 ± 0.23	7.66 ± 0.48	7.95 ± 0.47
HGB (g/dL)	15.12 ± 0.67	15.30 ± 0.76	14.70 ± 1.26	15.02 ± 0.97
HCT (%)	50.70 ± 4.24	48.80 ± 2.40	47.04 ± 3.01	48.70 ± 3.76
MCV (fL)	65.10 ± 3.64	61.97 ± 1.19	61.40 ± 1.02	61.34 ± 3.67
CHCM (g/dL)	29.88 ± 1.70	31.30 ± 0.43	31.16 ± 0.85	30.82 ± 1.26
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1.014 ± 99.32	1.420 ± 178.77 ^{a,b,c}	1.088 ± 69.05	1.093 ± 77.38
PPT (mg/dL)	7.32 ± 0.30	7.10 ± 0.62	6.80 ± 0.14	7.00 ± 0.46
Total leukocytes ($/\mu\text{L}$)	8.62 ± 1.59	8.42 ± 1.31	9.14 ± 1.32	7.12 ± 1.07
Band cells (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Neutrophils (%)	18.20 ± 5.93	12.60 ± 5.22	16.40 ± 3.20	16.40 ± 5.63
Lymphocytes (%)	80.60 ± 6.76	85.80 ± 4.96	82.00 ± 2.73	81.00 ± 5.61
Monocytes (%)	0.80 ± 1.30	1.20 ± 1.64	1.00 ± 0.70	2.20 ± 0.83
Eosinophils (%)	0.40 ± 0.54	0.40 ± 0.54	0.60 ± 0.54	0.40 ± 0.54
Basophiles (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Male				
RCB (10 ⁶ /μL)	7.93 ± 0.39	7.98 ± 0.39	7.96 ± 0.18	7.86 ± 0.25
HGB (g/dL)	14.94 ± 0.84	15.22 ± 0.60	15.20 ± 0.15	14.94 ± 0.34
HCT (%)	46.72 ± 2.55	46.82 ± 2.24	47.06 ± 1.66	46.56 ± 1.71
MCV (fL)	58.98 ± 1.62	58.72 ± 0.86	59.18 ± 2.69	59.46 ± 3.18
CHCM (g/dL)	31.94 ± 0.67	32.47 ± 0.36	32.26 ± 0.92	32.06 ± 1.14
PLT (10 ³ /μL)	882.00 ± 50.60	882.25 ± 50.68	935.40 ± 57.79	945.00 ± 33.71
PPT (mg/dL)	7.08 ± 0.33	6.75 ± 0.1	6.72 ± 0.22	6.56 ± 0.26 ^a
Total leukocytes (/μL)	10.34 ± 1.17	9.67 ± 6.94	9.90 ± 1.50	10.12 ± 1.18
Band cells (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.44	0.40 ± 0.54
Neutrophils (%)	19.60 ± 6.07	14.75 ± 8.55	14.20 ± 5.91	31.4 ± 2.70
Lymphocytes (%)	80.20 ± 7.59	84.50 ± 6.80	85.8 ± 6.97	66.20 ± 31.53
Monocytes (%)	0.20 ± 0.44	0.75 ± 0.50	0.40 ± 0.54	1.00 ± 1.00
Eosinophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.54	0.04 ± 0.54
Basophiles (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Results are expressed as mean ± SD. Values were significantly different when p < 0.05. ^aCompared with the control group. ^bCompared with the 400 mg/kg group. ^cCompared with the 600 mg/kg group. Total red blood cells (RBC); Hemoglobin (HGB); Hematocrit (HCT); Mean corpuscular volume (MVC); Mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM); Platelets (PLT); Total plasma proteins (PPT).

Table S7 - Biochemical parameters of female and male rats after 28 days of treatment with the CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Parameters	Groups			
	Control	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg
Female				
ALP (mg/dL)	67.40 ± 5.36	69.5 ± 3.10 ^b	70.33 ± 11.93 ^b	50.40 ± 3.28 ^a
ALT (U/L)	31.00 ± 4.35	29.40 ± 3.50	24.80 ± 10.28	29.00 ± 4.24
AST (U/L)	78.40 ± 10.35	61.00 ± 5.70 ^a	55.21 ± 8.01 ^a	60.20 ± 4.32 ^a

CHOL (mg/dL)	53.60 ± 3.84	52.60 ± 8.26	48.40 ± 16.27	51.20 ± 5.44
HDL (mg/dL)	24.61 ± 2.51	24.19 ± 6.35	27.07 ± 3.82	26.34 ± 2.67
LDL (mg/dL)	8.98 ± 1.78	6.66 ± 1.10	8.58 ± 1.58	7.55 ± 1.12
TP (mg/dL)	5.82 ± 0.37	5.58 ± 0.51	4.52 ± 1.70	5.80 ± 0.65
CRE (mg/dL)	0.72 ± 0.08	0.72 ± 0.04	0.52 ± 0.14 ^{a,b}	0.70 ± 0.07
Urea (mg/dL)	53.80 ± 2.48	55.60 ± 3.20	50.00 ± 9.13	52.00 ± 3.80
TG (mg/dL)	140.16 ± 55.34	123.16 ± 45.04	97.00 ± 27.22	137.00 ± 41.09
GGT (mg/dL)	1.00 ± 5.00	1.80 ± 9.00	1.20 ± 6.00	1.6 ± 8.00
Male				
ALP (mg/dL)	126.20 ± 5.71	113.00 ± 27.38	102.8 ± 14.56	120.00 ± 16.38
ALT (U/L)	47.4 ± 8.08	43.75 ± 2.21	46.40 ± 8.08	46.60 ± 3.91
AST (U/L)	85.60 ± 6.18	79.25 ± 3.77	82.40 ± 18.64	74.00 ± 6.92
CHOL (mg/dL)	64.40 ± 5.89	68.50 ± 2.64	69.40 ± 9.83	54.60 ± 31.20
HDL (mg/dL)	27.36 ± 2.46	27.94 ± 4.30	29.47 ± 3.65	27.18 ± 2.80
LDL (mg/dL)	9.30 ± 3.37	8.49 ± 0.96	9.22 ± 3.09	9.47 ± 1.61
TP (mg/dL)	6.50 ± 0.15	6.27 ± 0.17	6.24 ± 0.18	6.08 ± 0.14 ^a
CRE (mg/dL)	0.82 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00
Urea (mg/dL)	42.40 ± 4.87	47.75 ± 4.99	47.60 ± 4.56	47.20 ± 7.85
TG (mg/dL)	122.80 ± 25.58	124.75 ± 33.14	118.20 ± 26.07	127.40 ± 21.45
GGT (mg/dL)	1.60 ± 2.60	1.75 ± 1.25	2.00 ± 1.87	2.20 ± 1.30

Results are expressed as mean ± SD. Values were significantly different when $p < 0.05$. ^aCompared with the control group. ^bCompared with the 600 mg/kg group. Alkaline phosphatase (ALP); Alanine aminotransferase (ALT); Aspartate aminotransferase (AST); Cholesterol (CHOL); High density lipoprotein (HDL); Low density lipoprotein (LDL); Total serum protein (TP); Creatinine (CRE); Triglycerides (TG); Gamma-glutamyl transferase (GGT).

Table S8 – Evaluation of lipid peroxidation and carbonylated proteins in the kidney and liver of female and male rats after 28 days of treatment with CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Parameters	Groups				
	Control	200 mg/Kg	400 mg/Kg	600 mg/Kg	
Female					
Kidney	MDA	2.39 ± 0.37	2.19 ± 0.12	2.16 ± 0.19	1.94 ± 0.30
	Carbonyl	2.90 ± 0.36	2.74 ± 0.58	2.82 ± 0.38	1.90 ± 0.25 ^a
Liver	MDA	2.50 ± 0.30	2.15 ± 0.14	2.28 ± 0.24	2.16 ± 0.42
	Carbonyl	2.88 ± 0.43	2.24 ± 0.14	1.90 ± 0.78	2.57 ± 0.60

		Male			
Kidney	MDA	2.56 ± 0.58	2.29 ± 0.43	1.92 ± 0.05	2.18 ± 0.09
	Carbonyl	1.91 ± 0.75	1.96 ± 0.80	1.94 ± 0.36	1.88 ± 0.48
Liver	MDA	2.08 ± 0.55	2.15 ± 0.33	1.82 ± 0.30	1.61 ± 0.40
	Carbonyl	2.48 ± 0.48	1.94 ± 0.46	1.25 ± 0.53 ^b	0.98 ± 0.24 ^c

Results are expressed as mean ± SD. Values were significantly different when $p < 0.05$. ^aCompared with all groups. ^bCompared with the control group. ^cCompared with control group and 200 mg/kg group. MDA expressed in nmol MDA/mg prot. Carbonyl expressed in nmol carb/mg.

Table S9 - Evaluation of the enzymatic activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the kidney and liver of female and male rats after 28 days of treatment with CEA at doses of 200, 400 and 600 mg/kg.

Parameters		Groups			
		Control	200 mg/Kg	400 mg/Kg	600 mg/Kg
Female					
Kidney	CAT	23.54 ± 2.67	29.87 ± 9.17	25.72 ± 3.63	29.45 ± 3.59
	SOD	15.41 ± 2.14	13.08 ± 2.78	13.95 ± 1.92	14.10 ± 2.61
Liver	CAT	0.37 ± 0.06	0.38 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.47 ± 0.10
	SOD	11.11 ± 2.67	12.04 ± 2.11	12.08 ± 2.42	12.66 ± 1.51
Male					
Kidney	CAT	23.53 ± 2.52	24.88 ± 4.29	29.52 ± 1.48 ^a	29.40 ± 3.60 ^a
	SOD	16.45 ± 2.21	13.16 ± 2.00	11.10 ± 1.11 ^a	12.00 ± 1.80 ^a
Liver	CAT	0.58 ± 0.1	0.65 ± 0.19	0.55 ± 0.07	0.53 ± 0.08
	SOD	10.84 ± 1.98	11.20 ± 1.29	11.30 ± 1.67	12.48 ± 2.92

Results are expressed as mean ± SD. Values were significantly different when $p < 0.05$. ^aCompared with the control group. CAT expressed in U CAT/mg prot. SOD expressed in U SOD/mg prot.

6 DISCUSSÃO GERAL

Richardia brasiliensis é uma espécie da família Rubiaceae, conhecida principalmente por infestar regiões agrícolas, desenvolvendo-se entre culturas de soja e milho, sendo amplamente distribuída em locais onde atividades agrícolas são presentes, como o Rio Grande do Sul e a região Centro-Oeste brasileira (LORENZI; MATOS, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; TROPICOS, 2017; GALLON *et al.*, 2018). A população utiliza partes da planta, como infusos, decoctos ou plastos no tratamento do diabetes, queimaduras na pele, como vermífuga, no tratamento da hemorroida, dentre outros. Apesar de sua utilização como medicina alternativa, pouco se conhece sobre seus constituintes fitoquímicos e as ações biológicas que a planta, ou parte dela, possui (PINTO, 2008; FIGUEIREDO, 2005; TENÓRIO-SOUZA, 2009; CANALE, 2012; MORAIS *et al.*, 2013).

Deste modo, esta pesquisa buscou realizar a caracterização, a identificação e a quantificação das substâncias fitoquímicas presentes em extratos de *R. brasiliensis* obtidos em diferentes períodos do ano. Além de determinar a capacidade antioxidante, avaliar a indução de danos oxidativos nas membranas celulares, avaliar a capacidade antiproliferativa em células tumorais e averiguar através de modelos *in vitro* a genotoxicidade e citotoxicidade e *in vivo*, a toxicidade.

O *screening* fitoquímico foi o passo inicial para a pesquisa, no qual, através de reações colorimétricas de caracterização e cromatografia em camada delgada (CCD), grupos de metabólitos secundários, como heterosídeos antociânicos, gomas, mucilagens, taninos, amino-grupos, esteroides e/ou triterpenos, alcaloides, fenóis, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides foram identificados. Grande parte dos grupos de substâncias já haviam sido reportados na literatura (PINTO, 2008; FIGUEIREDO, 2005; TENÓRIO-SOUZA, 2009; CANALE, 2012; MORAIS *et al.*, 2013; MARTINS; NUNEZ, 2015), tanto para a família Rubiaceae quanto para a espécie *R. brasiliensis*. Já as substâncias antraquinonas são marcadores quimiotaxonômicos para a subfamília Rubioideae (BOLZANI *et al.*, 2001) e em nossas análises de caracterização não foram observadas através dos métodos utilizados.

Para a identificação e quantificação das substâncias fitoquímicas, duas análises independentes, foram utilizadas: Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UHPLC-ESI-MS/MS), na qual a identificação das substâncias fitoquímicas dos extratos ocorreram por comparação (área do pico e tempo de retenção) com 24 padrões de compostos fenólicos e Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada à

Espectrometria de Massa de Alta Resolução (UHPLC-ESI-HRFTMS), que utilizou o método de desreplicação, comparando a forma molecular de cada substância identificada, com substâncias fitoquímicas já relatadas para o gênero ou família (SCIFINDER, 2020; DICIONÁRIO DE PRODUTOS NATURAIS, 2020).

Na identificação dos compostos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS, foram identificados ácido clorogênico, catequina, ácido vinílico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido rosmarínico, quercitrina, ácido trans-cinâmico, quercetina, luteolina, apigenina e canferol. Rutina e ácido clorogênico foram os analitos predominantes nas amostras, sendo encontrados em todas as estações e em altas concentrações. Já os analitos como ácido rosmarínico, quercitrina e apigenina não foram encontrados em alguns extratos e, quando identificados, apareceram apenas como traços.

Essas variações da presença e concentração de substâncias fitoquímicas são muito comuns quando se trata de espécies vegetais, pois rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos do metabolismo secundário são diretamente influenciadas por variáveis ambientais. Essas influenciam na presença de maior ou menor quantidade de compostos, bem como o tecido ou órgão da planta, onde estes compostos são sintetizados e armazenados (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011; LIU, *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2019, BOUABID *et al.*, 2020, FARAG *et al.*, 2020; HAYAT *et al.*, 2020).

Variações dos constituintes fitoquímicos também foram observados nas análises realizadas por UHPLC-ESI-HRFTMS. A diferença observada na composição dos extratos das partes aéreas e raízes corroboram com dados que demonstraram que compostos do metabolismo secundário podem ser sintetizados e armazenados em diferentes partes e tecidos das plantas, conforme a demanda de recursos (FANG; FERNIE; LUO, 2019). Além de fenólicos como flavonoides e cumarinas, os principais compostos identificados foram alcaloides e terpenoides e, em menor escala, ácido benzoico e derivados de fenilpropanoides, feniletanoides e iridoides.

No doseamento de polifenóis totais, flavonoides e taninos por espectrofotometria também foram encontradas alterações nas concentrações dos compostos secundários nos diferentes extratos. O maior teor de polifenóis totais foi observado nos extratos de primavera, os flavonoides tiveram altas dosagens no outono e os taninos no verão, refletindo mais uma vez a influência direta de fatores bióticos e abióticos que incidem sobre a planta e seu metabolismo (ROCKENBACH *et al.*, 2018). A presença dos maiores teores dessas substâncias em estações consideradas mais quentes e úmidas, estão intimamente relacionadas a defesa e proteção da

planta contra a radiação UV e ataque de polinizadores (COUTINHO *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2013; WEN; ALSEEKH; FERNIE, 2020).

Uma das principais características das espécies vegetais que possuem altas concentrações de substâncias fenólicas é sua capacidade em atuar como antioxidantes naturais contra o estresse oxidativo (LI *et al.*, 2020). Há um crescente interesse em compostos presentes em alimentos, plantas e bebidas, que possuam benefícios à saúde e vários estudos têm sido dedicados às propriedades antioxidantes dos polifenóis.

Nos ensaios no qual o indutor de oxidação foi o AAPH, obtivemos significativa capacidade antioxidante dos extratos, demonstrando que essa propriedade é consequência da relações atividade-estrutura relacionadas a sua ação redox (GRZESIK *et al.*, 2018), pois, no geral, quanto mais substituintes hidroxilas a molécula possuir, mais forte será a atividade antioxidante contra radicais peroxila (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997).

No ensaio, no qual o indutor de oxidação foi o DPPH, nossos resultados pareceram não ter sido relevantes, sendo que os extratos de *R. brasiliensis* apresentaram baixa atividade antioxidante quando comparado ao padrão ácido ascórbico. Esse dado sugere que a ação anti-radicalar dos extratos pode responder de diferentes maneiras aos diferentes radicais ou oxidantes, dependendo do mecanismo de oxidação (ALVES *et al.*, 2010; BACCARIN *et al.*, 2015).

Como descrito anteriormente, apesar de sua capacidade antioxidante, compostos bioativos como os polifenóis, podem tornar-se uma molécula altamente reativa aumentando o estresse oxidativo (CHIKARA *et al.*, 2018), já que algumas substâncias naturais apresentam efeito bifásico de atuação, sendo um antioxidante em baixas concentrações e pró-oxidante quando em doses mais elevadas (ZHANG; TSAO, 2016). Essa condição de pró-oxidantes também é observada na presença de metais de transição (ALVES *et al.*, 2010).

Dessa forma, avaliamos a capacidade dos extratos de *R. brasiliensis* em atuarem como oxidantes causando danos às células. Foi observado que os EBRb causaram danos aos lipídios de membrana quando utilizados em altas concentrações, como pôde ser visto no ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que mediu o subproduto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Já os níveis de ON e EROs, apresentaram pequenas alterações em alguns extratos, porém sem diferir significativamente ao controle negativo.

Apesar de breves alterações nos níveis desses marcadores oxidativos, há a necessidade de maiores averiguações quanto aos possíveis danos que as substâncias fitoquímicas presentes

nos extratos de *R. brasiliensis* podem estar causando em células saudáveis. Visto que essas variações em parâmetros oxidativos parecem estar relacionadas, o que pode culminar em importantes eventos patogênicos por serem moléculas reguladoras para muitas funções fisiológicas essenciais. Pequenas alterações e modificações nas cadeias poli-insaturadas alteram a fluidez e comprometem a integridade das membranas, resultando em danos celulares e perda das funções, que estão associados ao desenvolvimento de vários tipos de carcinomas, diabetes, envelhecimento e condições inflamatórias (BANRJEE *et al.*, 2008; PISOSCHI; POP, 2015; ALCHE, 2019; GEGOTEK *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2020).

Em relação aos ensaios que avaliaram a citotoxicidade, na análise de viabilidade celular, foi observado que os EBRb mantiveram altas a viabilidade das células saudáveis, demonstrando não estarem afetando funções metabólicas (FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010). Entretanto, quando avaliamos a presença de DNA dupla fita (dsDNA), houve aumento nos níveis da molécula em solução, nas concentrações mais altas, de modo que os extratos demonstraram uma citotoxicidade moderada através de alguns mecanismos intracelulares específicos. Na análise de genotoxicidade, foi empregado o ensaio de dano ao DNA cometa ou eletroforese de gel em célula única, no qual é utilizado para detectar a frequência de quebras que o DNA sofre quando em contato com alguma substância mutagênica ou carcinogênica (ERIKEL *et al.*, 2019). Em nossas análises, os EBRb apresentaram baixas extensões de dano, independente das concentrações testadas.

As substâncias fitoquímicas por possuírem uma gama de efeitos celulares e moleculares, atuando em vias de transdução de sinais que culminam em vários eventos fisiológicos essenciais, podem oferecer uma alternativa terapêutica, preventiva ou ainda adjuvante para o câncer (CAO *et al.*, 2019; BRAIUC, *et al.*, 2020). Um dos principais mecanismos que mantém a renovação celular e ajuda na eliminação dessas células cancerosas é a apoptose. Dessa forma, substâncias que alteram o equilíbrio em células alteradas, a favor da apoptose, são promissoras e alvos de estudos para atuarem como agentes quimioterápicos (MISHRA *et al.*, 2018).

O extrato bruto de *R. brasiliensis* foi avaliado quanto a sua capacidade em atuar como um agente antiproliferativo frente a linhagens de células tumorais. Nossos resultados demonstraram que o extrato foi promissor em diminuir a viabilidade de algumas linhagens, sendo mais sensível para a linhagem A375 (melanoma humano) e também foi capaz de induzir a apoptose em proporções elevadas. Esses achados sugerem que substâncias presentes no EBRb têm a capacidade de penetrar e alterar as membranas de células tumorais, estando envolvidos nos processos apoptóticos, levando à redução da viabilidade celular (YAN *et al.*, 2010). Logo,

faz-se necessário a realização de mais estudos a fim de determinar os mecanismos que levaram a essa indução da apoptose (por exemplo, aumento de ROS, parada do ciclo celular na fase G2/M, disfunção e perda do potencial de membrana mitocondrial, expressão de proteínas Bax/Bcl-2, entre outros).

Além dos padrões de segurança e avaliação das atividades biológicas *in vitro*, buscamos averiguar a possível toxicidade *in vivo* do extrato bruto de *R. brasiliensis*. Para esse ensaio, utilizamos os protocolos OECD 423 e 407, no qual foi avaliada a toxicidade oral aguda e em doses repetidas, em um período de 14 dias somente com ratas fêmeas para o primeiro protocolo e 28 dias com ratos machos e fêmeas para o segundo.

No ensaio da toxicidade oral aguda, após o período de tratamento, nenhuma mortalidade foi observada bem como nenhum sinal de toxicidade e dessa forma o EBRb pode ser classificado na categoria 5 de acordo com o Sistema Geral Harmonizado da OECD, no qual a dose letal é estimada entre 2000 a 5000 mg/kg (OECD, 2001).

Para o ensaio em doses repetidas de 28 dias também não foram observados sinais de toxicidade e nenhuma morte dos animais foi registrada. Apesar de algumas pequenas alterações em parâmetros como o peso do baço em ratos machos e parâmetros bioquímicos e hematológicos, o aspecto e morfologia dos órgãos apresentaram-se normais e as demais análises estavam dentro de padrões aceitáveis para a espécie (LIMA *et al.*, 2014). O conjunto de resultados que avaliam alterações no peso corporal dos animais, no peso e morfologia dos órgãos bem como parâmetros hematológicos, bioquímicos, oxidativos e análises de enzimas antioxidantes, podem reportar precocemente efeitos indesejáveis, sendo preditivos de toxicidade em humanos (LEE *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2020). Assim, os resultados encontrados neste estudo sugerem que o EBRb, quando utilizado nas condições do estudo, não apresenta sinais de toxicidade, sendo que mais estudos são necessários para assegurar seu uso seguro pela população

Os resultados obtidos nesse estudo são um primeiro passo e indicativo de que extratos da espécie *Richardia brasiliensis* podem ser utilizados pela população no tratamento de seus enfermos. No entanto, seu uso indiscriminado em altas doses pode levar a algum tipo de dano celular e, portanto, devem ser utilizados com cautela. Além disso, fica evidenciando que mais estudos são necessários a fim de isolar constituintes fitoquímicos já identificados que podem ser promissores (isolados ou não) para o tratamento de células tumorais. Também há a necessidade da realização de mais ensaios que determinem os mecanismos de ação que levam aos processos apoptóticos observados.

7 CONCLUSÃO

Em nossos estudos foram identificados nos extratos aquosos de *Richardia brasiliensis*, heterosídeos antociânicos, gomas, mucilagens, taninos e amino-grupos. Nos extratos hidroetanólico foram identificados esteroides e/ou triterpenos, alcaloides, fenóis, cumarinas, ácidos orgânicos e flavonoides.

Na determinação de polifenóis por UHPLC-ESI-MS/MS foram identificados quatorze polifenóis, em maiores ou menores concentrações nos diferentes extratos obtidos nas quatro estações do ano. Destes, os compostos fenólicos predominantes foram o ácido clorogênico e a rutina. Na análise fitoquímica por UHPLC-ESI-HRMS, foram identificados principalmente alcaloides e terpenos e em menor escala, também foram detectados derivados fenilpropanoides, flavonoides, cumarinas, derivados feniletanoides, derivados do ácido benzoico e iridoides.

Nas dosagens de polifenóis totais, flavonoides e taninos, foram observados maiores teores de polifenóis na primavera, flavonoides apresentaram concentrações semelhantes no outono, inverno e primavera, e taninos foram encontrados em maiores teores no verão.

Na capacidade antioxidante, os diferentes métodos avaliados demonstraram que os extratos de *R. brasiliensis* atuam de maneira diferente dependendo do tipo de indutor. Foi observado que os extratos demonstraram pronunciada capacidade antioxidante contra a hemólise induzida por AAPH e no ensaio cinético que avaliou a capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), sendo mais efetivo que o padrão Trolox.

Na avaliação da indução de oxidação, os extratos elevaram os níveis de MDA, principalmente na concentração de 500 µg/mL, e apresentaram pequenas alterações nos níveis de ON e EROs, sem diferir do controle negativo.

Nos ensaios de cito e genotoxicidade, a viabilidade celular não foi afetada pelos extratos em nenhuma concentração, mantendo-as em cerca de 90% de viabilidade. Porém, os extratos foram capazes de aumentar a presença de fita dupla de DNA livres na solução. Já em relação aos danos ao DNA pelo ensaio do Cometa alcalino, os extratos apresentaram comportamento dose-dependente e baixos índices de dano.

Na atividade antiproliferativa, os extratos foram eficientes, principalmente na linhagem celular tumoral de melanoma humano (A375), no qual inviabilizou essas células em mais de 95% após 72h. Além disso, foi observado que em mais de 80% das células dessa mesma linhagem, ocorreu apoptose.

Na toxicidade *in vivo*, os extratos não causaram sinais de toxicidade e nenhuma mortalidade foi observada. As alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos estão dentro de faixas aceitáveis para a espécie.

Assim, o conjunto dos resultados da pesquisa, demonstrou que a espécie *Richardia brasiliensis* é rica em compostos com importantes funções medicinais e, algumas das atividades aqui avaliadas, indicam que a planta em estudo possui potencial atividade farmacológica como agente antiproliferativo, além de nortear o caminho a ser seguido em estudos adicionais com a espécie.

8 LIMITAÇÕES

Os objetivos propostos para essa tese foram alcançados quase que em sua integralidade. Entretanto, algumas limitações no decorrer da pesquisa foram evidenciadas, impossibilitando a realização de análises que poderiam complementar alguns dados obtidos ao longo do estudo e responder questões que ficaram dúbias.

Dentre as limitações encontradas para a realização e desenvolvimento desta tese de Doutorado, a falta de recursos para aquisição de materiais de consumo foi uma questão de destaque. Porém, com a colaboração de diferentes grupos de pesquisa em diferentes Universidades (posso citar Universidade Franciscana e Universidade Federal do Pampa), conseguimos contornar e realizar análises de suma importância para a obtenção de alguns resultados.

Outra limitação importante foi a minha mudança de cidade, que ocorreu praticamente no meio do período em que estava realizando o Doutorado. Devido à distância, houve dificuldade na realização de algumas análises.

A publicação dos artigos foi outra limitação para a apresentação dessa Tese. No entanto, após longo período de esperar e troca de periódicos, recebemos os aceites para as publicações.

Por último e a mais importante limitação encontrada, foi a “parada” no ano de 2020 e 2021 devido à pandemia de covid-19 que, de forma indireta, atrasou a finalização dessa tese de Doutorado.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, a espécie *Richardia brasiliensis* mostrou-se promissora no seu uso como planta medicinal. Dessa forma, recomenda-se o desenvolvimento de metodologias mais específicas que visem determinar, além dos mecanismos de ação do extrato sobre células A375 de melanoma humano, no qual foram capazes de diminuir a viabilidade celular em mais de 95%, qual ou quais substâncias ativas do extrato da planta possuem essa ação e, assim, realizar procedimentos a fim de isolar os mesmos.

Essas evidências são importantíssimas no cenário atual, já que parte dos medicamentos usados na clínica são derivados de substâncias naturais. Assim, essa pesquisa foi um primeiro passo para demonstrar que espécies não tão conhecidas e que estão sendo extintas podem atuar no tratamento de uma diversidade de doenças.

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE, K. E. *et al.* *Morinda lucida* Benth (Rubiaceae): A review of its ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 276, p. 114055, 2021.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos** - Versão 2.2013. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/>. Acesso em: janeiro de 2020.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, p. 763-765, 2003.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 239-244, 2011.
- AHMADINEJAD, F. *et al.* Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. **Antioxidants**, v. 6, p. 1-15, 2017.
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 1720-1731, 2011.
- ALCHÉ, J. D. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. **Redox Biology**, v. 23, p. 101136, 2019.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e Agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- ALQETHAMI, A.; ALDHEBIANI, A. Y. Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: Phytochemical screening. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 805-812, 2021.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- BACCARIN, T. *et al.* Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 153, p. 127-136, 2015.

BACCARIN, T. *et al.* Protection against oxidative damage in human erythrocytes and preliminary photosafety assessment of *Punica granatum* seed oil nanoemulsions entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction. **Toxicol in Vitro**, v 30, p. 421-428, 2015.

BADISA, R. B. *et al.* Selective Anticancer Activity of Pure Licamichauxiioic-B Acid in Cultured Cell Lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 141-145, 2006.

BANERJEE, A. *et al.* Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.

BARRY, H.; MATTHEW, W. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

BASS, D. A. *et al.* Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BHANOT, A. *et al.* Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, p. 09-26, 2011.

BIRCHFIELD, A.; MCINTOSH, C. A. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. **Current Plant Biology**, v. 24, p. 100163, 2020.

BOLIGON, A. A. *et al.* Protective Effects of Extracts and Flavonoids Isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against Chromosome Damage in Human Lymphocytes Exposed to Hydrogen Peroxide. **Molecules**, v. 17, p. 5757-5769, 2012.

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

BORHIDI, A. **Rubiáceas de México**. Instituto de Biologia Universidade de Pécs, Hungria, 2. Ed. 2012.

BOUABID, K. *et al.* Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 253, p. 112640, 2020.

BOURGAUD, F. *et al.* Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.

BRAICU, C. *et al.* Natural compounds modulate the crosstalk between apoptosis- and autophagy-regulated signaling pathways: Controlling the uncontrolled expansion of tumor cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 2 p. 30111, 2020.

BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRONDANI, J. C. *et al.* Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 202, p. 147-153, 2017.

BUTNARIU, M. Action and Protection Mechanisms of Free Radicals. **Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics**, v. 3, p. 3-6, 2012.

CAMPOS, K. K. D. *et al.* The antioxidante and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 48, p. 9-20, 2017.

CANALE, F. S. **Ação Fungicida e Bactericida de Extratos e Frações de *Richardia brasiliensis* Gomes**. 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) – Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, 2012.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CAO, S. Y. *et al.* Dietary natural products and lung cancer: Effects and mechanisms of action. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 316-331, 2019.

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

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 107-120, 2018.

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

CHEN, Q. *et al.* Occurrence and biosynthesis of plant sesterterpenes (C25), a new addition to terpene diversity. **Plant Communications**, v. 2, p. 100184, 2021.

CHIKARA, S. *et al.* Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in câncer chemoprevention and treatment. **Cancer Letters**, v.413, p. 122-134, 2018.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, 2002.

CHOI, W. S. *et al.* The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology**, v. 280, p. 164-170, 2012.

CHOUDHURY, K. D. *et al.* Bioactivities of some ethno-medicinal Rubiaceous plants available from Assam – a review. **Pleione**, v. 6, p. 56 – 65, 2012.

- CODIGNOTO, P. S. C. *et al.* *In vitro* cytotoxicity and biological activities of *Genipa americana* (Rubiaceae) ethanolic extracts. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, p. 385-390, 2017.
- COELHO, V. P. M. *et al.* Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlttdl.) K. Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 170-177, 2006.
- CORSO, M. *et al.* Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions and regulations. **Plant Science**, v. 296, p. 110471, 2020.
- COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 47, p. 47-58, 2010.
- COUTINHO, I. D. *et al.* Influência da variação sazonal nos teores de flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtacea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 322-327, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Ethnopharmacology**, v. 1, p. 1-7, 2005.
- CURTI, V. *et al.* *In vitro* polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. **Seminars in Cancer Biology**, v. 46, p. 119-131, 2017.
- DAS, B. *et al.* Dietary phytochemicals in the regulation of epithelial to mesenchymal transition and associated enzymes: A promising anticancer therapeutic approach. **Seminars in Cancer Biology**, v. 56, p. 196-218, 2019.
- DELPRETE, P. G. *et al.* Flora ilustrada **Catarinense: Rubiáceas**. Vol.1. 2004.
- DELPRETE, P. G. *et al.* **Flora ilustrada Catarinense: Rubiáceas**. Vol.1. 2005.
- DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 63, p. 101-128, 2012.
- DEYNO, S. *et al.* Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. **Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, p. 1-11, 2020.
- DICIONÁRIO DE PRODUTOS NATURAIS – **DNP**. Disponível em: <http://dnp.chemnetbase.com>. Acesso em novembro de 2021.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 421-431, 1990.
- DUTTA, S. *et al.* Natural products: An upcoming therapeutic approach to câncer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 240-255, 2019.

ERIKEL, E.; YUZBASIOGLU, D.; UNAL, F. *In vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p.171-181, 2019.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v. 26, p. 335-340, 2002.

FACCIN, H. *et al.* Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1427, p. 111–124, 2016.

FAKHRI, S. *et al.* Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, p. 30040-7, 2020.

FAN, Z. *et al.* UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities. **Food Chemistry**, v. 318, p. 126512, 2020.

FANG, C.; FERNIE, A.; LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 24, p. 83-98, 2019.

FARAG, R. S. *et al.* Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00536, 2020.

FERNANDO, W; RUPASINGHE, H. P. V.; HOSKIN, D. W. Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? **Cancer Letters**, v. 452, p. 168-177, 2019.

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

FIGUEIREDO, A. D. L. **Estudo Farmacognóstico e Avaliação Antimicrobiana de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

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

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

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **European Journal of Cancer**, v. 46, p. 1882–1891, 2010.

GALLON, M. *et al.* Environmental factors' action on the germination process and initial growth of weeds of Rubiaceae Family. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 26-33, 2018.

GEGOTEK, A. *et al.* Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, p. 203-219, 2019.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GRANATO, D. *et al.* Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.

GRZESIK, M. *et al.* Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480-492, 2018.

GUEX, C. G. *et al.* Safety assessment of ethanolic extract of *Olea europaea* L. leaves after acute and subacute administration to Wistar rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 395-399, 2018.

HÁ, T. T. N. *et al.* Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Vírus Infection. **Plos One**, v. 6, p. 1-7, 2011.

HAYAT, J. *et al.* Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. **Heliyon**, v. 6, p. e05609, 2020.

IJAZ, S. *et al.* Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1643-1651, 2018.

IQBAL, J. *et al.* Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 1129-1150, 2017.

IQBAL, J. *et al.* Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1381-1393, 2019.

KAROU, S. D. *et al.* Sub-Saharan Rubiaceae: A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, p. 149-169, 2011.

KARUNAMOOTTHI, K. *et al.* Traditional Medicinal Plants: A Source of Phytotherapeutic Modality in Resource-Constrained Health Care Settings. **Tropical Review Article**, v. 18, p. 67-74, 2013.

KAUR, R. *et al.* Plants as a source of anticancer agentes. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, p. 119-124, 2011.

KAUR, V. *et al.* Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in câncer chemoprevention and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 564-586, 2018.

- KHARCHOUFA, L. *et al.* Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: Toxicity concerns. **Toxicon**, v. 154, p. 90-113, 2018.
- KOPACZYK, J. M. *et al.* The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli. **Environmental and Experimental Botany**, v. 180, p. 104197, 2020.
- LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 65-72, 2010.
- LEE, M. Y. *et al.* Subchronic oral toxicity studies of the traditional herbal formula *Bangpungtongseong-san* in Crl: CD (SD) rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 720–725, 2012.
- LEI, C. S. *et al.* Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 51, p. 105–113, 2018.
- LÉON-GONZÁLEZ, A. J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, p. 371-380, 2015.
- LEZCANO, V. *et al.* Antitumor and antioxidant activity of the freshwater macroalga *Cladophora surera*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p.1-9, 2018.
- LI, G. *et al.* Role of luteolin extracted from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaves in protecting HepG2 cells from TBHP-induced oxidative stress and its cytotoxicity, genotoxicity. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104196, 2020.
- LI, P. F. *et al.* Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 404, p. 249-252, 1997.
- LI, X. *et al.* Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 110–115, 2010.
- LIMA, C. M. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, p. 034601, 2014.
- LIMA FILHO, O. C. *et al.* Evaluation of the citotoxicity of the essential oil of *eremanthus erythropappus* on breast cancer cells MCF-7. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, p. 4699-4727, 2020.
- LIMA, R. *et al.* Acute and subacute toxicity and chemical constituents of the hydroethanolic extract of *Verbena litoralis* Kunth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 76-84, 2018.
- LIU, R. H.; FINLEY, J. Potential cell culture models for antioxidant research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, p. 4311-4314, 2005.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92-94, 2005.

LIU, W. *et al.* Influence of Ecological Factors on the Production of Active Substances in the Anti-Cancer Plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. **Plos One**, v. 10, p. 0122981, 2015.

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

MACEDO, J. M. *et al.* Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 585-590, 2013.

MAIMATI, A. *et al.* Improvement of Total Flavonoids from *Dracocephalum moldavica* L. in Rats with Chronic Mountain Sickness through ¹H-NMR Metabonomics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 3, p. 6695346, 2021.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, v. 20, p. 13422-13495, 2015.

MASEVHE, N. A. *et al.* The traditional use of plants to manage candidiasis and related infections in Venda, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 364-372, 2015.

MATIAS, R. *et al.* Chemical constituents and antifungal potential of the *Richardia brasiliensis* (Gomes) ethanolic extract. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 21, p. 457-465, 2018.

MENDONÇA, A. C. A. *et al.* Prospecção Fitoquímica de *Psychotria colorata* (Willd. Ex. R. & S.) Mull. Arg. e *P. hoffmannseggiana* (R. & S.) Mull. Arg. **Caderno de Cultura e Ciências**, v. 13, p. 7-16, 2015.

MENEGATI, S. E. L. *et al.* Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 1096-1102, 2016.

MENG, D. *et al.* Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 467-479, 2017.

MESA-VANEGAS, A. M. *et al.* Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v.12, p. 592 – 602, 2013.

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

MISHRA, R. *et al.* *Viscum articulatum* Burm. f. aqueous extract exerts antiproliferative effect and induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 91-102, 2018.

MOCAN, A. *et al.* Determination of lignans and phenolic components of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using HPLC-ESI-ToF-MS and HPLC-online TEAC: Contribution of individual components to overall antioxidant activity and comparison with traditional antioxidant assays. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 579–594, 2016.

MONDO, A. D.; SANSONE, C.; BRUNET, C. Insights into the biosynthesis pathway of phenolic compounds in microalgae. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 1901-1913, 2022.

MONTAGNER, G. F. F. *et al.* Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicol in Vitro**, v. 24, p. 1410-1416, 2010.

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

MORA-VÁSQUEZ, S. *et al.* Application of metabolic engineering to enhance the content of alkaloids in medicinal plants. **Metabolic Engineering Communications**, v. 14, p. e00194, 2022.

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

MOURA, A. P. G. *et al.* Essential oil from fruit of *Xylopi langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 3093-3102, 2017.

MOURA, L. T. S.; MARUO, V. M. Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos de *Psychotria colorata* – Revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, 2014.

MUNYENDO, L. M. *et al.* Coffee phytochemicals and post-harvest – A complex and delicate balance. **Journal of Food Compositions and Analysis**, v. 102, p. 103995, 2021.

MURAKAMI, A. Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols via hormesis. **Current Opinion in Toxicology**, v.30, p. 100337, 2022.

NEMBO, E. N.; HESCHELER, J; NGUEMO, F. Stem cells in natural product and medicinal plant drug discovery—An overview of new screening approaches. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110730, 2020.

NETO, S. J. S.; PEIXOTO, A. L. **Rubiaceae do Parque Nacional do Itatiaia Rio de Janeiro, Brasil**. Ministério do Meio Ambiente – ICMBio. Boletim Número 14, 2012.

NGUYEN, T. *et al.* *In vitro* toxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of *Nigella sativa* extracts from different geographic locations. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 132-141, 2019.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, v.5, p. 27986-28006, 2015.

NOGUEIRA, D. R. *et al.* *In vitro* antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, v. 34, p. 2758-2772, 2013.

NOGUEIRA-LIBRELOTTO, D. R. *et al.* Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles functionalized with a pH-responsive amphiphile improved the *in vitro* antineoplastic effects of doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 147, p. 326-335, 2016.

NUNES, A. T. *et al.* Plants used to feed ruminants in semi-arid Brazil: A study of nutritional composition guided by local ecological knowledge. *Journal of Arid Environments*, v. 135, p. 96-103, 2016.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 2001. **Guideline for testing of chemicals**. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adopted: 17th December 2001.

OECD. 2008. Guideline for testing of chemicals. **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. Adopted: 3 October 2008.

OHKAWA, H.; YAGI, N. O. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, N. A. *et al.* Acute and subacute (28 days) toxicity of green coffee oil enriched with diterpenes cafestol and kahweol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 110, p. 104517, 2020.

ONTAWONG, A. *et al.* *Coffea arabica* pulp aqueous extract attenuates oxidative stress and hepatic lipid accumulation in HepG2 cells. *Journal of Herbal Medicine*, v. 29, p. 100465, 2021.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4619 - 4629, 2001.

PAIVA, A. M. *et al.* Rubiaceae ornamentais do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, R.J. *Floresta e Ambiente*, v. 16, p. 39-46, 2009.

PANTALEÃO, C; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais murinos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 69, p. 439-445, 2010.

PEREIRA, G. F. *A Família Rubiaceae Juss. Na Vegetação Ripária de um Trecho do Alto Rio Paraná, Brasil, com Ênfase na Tribo Spermaceae*. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2007.

PEREIRA, Z. V. *et al.* Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, v. 20, p. 207-224, 2006.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, p. 89-96, 2008.

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

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

PISOSCHI, A. M; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

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

RAINA, P. *et al.* Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of *O. sanctum* in Wistar rats: clinical, hematological, biochemical and histopathological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 509-517, 2015.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 357-363, 1994.

RIBEIRO, N. E. *et al.* Acute and repeated dose 28-day oral toxicity of *Chrysobalanus icaco* L. leaf aqueous extract. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 113, p. 104643, 2020.

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

ROCKENBACH, A. P. *et al.* Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, p. 59-70, 2018.

ROSALES, P. F. *et al.* Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities. **Fitoterapia**, v. 143, p. 104558, 2020.

SANTOS, J. S. *et al.* Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348-358, 2018.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 6. Ed. Editora da UFSC e UFRGS, 2007. p.403-434.

SCHALM O.W. **Veterinary Hematology**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 664p, 1970.

SCIFIDER. Disponível em: <https://scifinder.cas.org/>. Acesso em novembro de 2021.

SEIFRIED, H. E. *et al.* A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SEYFRIED, T. N.; SHELTON, L. M. Cancer as a metabolic disease. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, 2010.

SHANMUGAM, M. K. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40, p. 35-47, 2016.

SINGH, N. *et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOARES, D. B. S. *et al.* *Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 927-938, 2017.

SOUZA, P. O. *et al.* Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 1-28, 2018.

SOUZA, R. K. D. *et al.* Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, p. 140-156, 2013.

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

SUN, M.; ZIGMAN, S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. **Analytical Biochemistry**, v. 90, p. 81-89, 1978.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TANAKA, T. Role of Apoptosis in the Chemoprevention of Cancer. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 5, p. 89-91, 2013.

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

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

THOMAS, A. S. *et al.* Evaluation of cytotoxic activity of protein extracts from the leaves of *Morinda pubescens* on human cancer cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 99-104, 2017.

TRESINA, P. S. *et al.* Natural Products in Drug Discovery: Approaches and Development. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, p. 93-110, 2021.

TROJAN-RODRIGUES, M. *et al.* Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 155-163, 2012.

TRÓPICOS. **Missouri Botanical Garden**. Saint Louis, Missouri, 2017. Disponível em: <http://www.tropicos.org/>. Acesso em: julho de 2017.

UNNATI, S., *et al.* Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, p. 16-23, 2013.

VALENTE, L. M. M. *et al.* Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 216-223, 2006.

VARGAS-MAYA, N. *et al.* Refinement of the Griess method for measuring nitrite in biological samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 187, p. 106260, 2021.

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

VIEGAS JR, C. *et al.* Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VINOTHIYA, K.; ASHOKKUMAR, N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 640-652, 2017.

WANDERLEY, M. G. L. *et al.* **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo Online**. Instituto de Botânica, v. 5, 2007.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, p. 1875-1884, 2008.

WANG, S. *et al.* Natural variance at the interface of plant primary and specialized metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 67, p. 102201, 2022.

WEN, W.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant Kingdom. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 100-108, 2020.

WENKAI, H. *et al.* Identification of key genes in the biosynthesis pathways related to terpenoids, alkaloids and flavonoids in fruits of *Zanthoxylum armatum*. **Scientia Horticulturae**, v. 290, p. 110523, 2021.

WONG, K. I. *et al.* Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria* sps (Rubiaceae). **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 302-311, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em maio de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020**. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-newcases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>. Acesso em junho de 2022.

YAN, S. *et al.* Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 24, 842–848, 2010.

YUZBASIOGLU, D.; ENGUZEL-ALPEREN, C.; UNAL, F. Investigation of *in vitro* genotoxic effects of an anti-diabetic drug sitagliptin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 235-241, 2018.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidante and anti-inflammatory effects. **Food Science**, v.8, p. 33-42, 2016.

ANEXO I – COMPROVANTE DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A2F514D

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A2F514D**
 Usuário: **UFSM**
 CPF/CNPJ: **95.591.764/0001-05**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Richardia brasiliensis

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS in vitro e in vivo DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE Richardia brasiliensis Gomes**

Equipe

Rafaela Castro Dornelles	UFSM
Melânia Palermo Manfron	UFSM
Camille Gaube Guex	UFSM
Isabel Cristina da Costa Araldi	UFSM
Lauren Papis	UFSM
Liliane de Freitas Bauermann	UFSM

Data do Cadastro: **18/06/2018 19:21:10**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:49** de **16/11/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO II – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO (CEUA)



Comissão de Ética no Uso de Animais
da
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 01 de junho de 2021
CEUA N 4738280618

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Liliane De Freitas Bauermann
Área: Farmacologia


Título da proposta: "AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS *in vivo* DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Richardia brasiliensis* Gomes".


Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM (ID 002864)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 20/maio/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitar prorrogação de prazo para a finalização do projeto. Essa solicitação justifica-se porque devido a pandemia de COVID-19 as análises histológicas estão em atraso para que o manuscrito possa ser finalizado. Dessa forma necessitamos estender o prazo final do projeto.".

Comentário da CEUA: "Emenda aprovada. Solicita prorrogação de prazo final para 12/2021.".


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

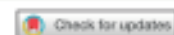

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO III – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO (ARTIGO I)

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2081850>



SHORT COMMUNICATION



Phytochemical characterisation, antioxidant capacity, and *in vitro* toxicity of *Richardia brasiliensis* gomes crude extracts

Rafaela Castro Dornelles^a , Camille Gaube Gueix^a , Ritiel Corrêa da Cruz^b, Rachel de Lima^c, Daniele Rubert Nogueira-Librelotto^b, Gustavo de Andrade Ugalde^d, Henrique Faccin^e, Alencar Kolinski Machado^f , Michel Mansur Machado^g, Carine Viana Silva^c , Melânia Palermo Manfron^{b,c} and Liliane de Freitas Bauermann^{a,c}

^aPostgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

^bDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

^cPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

^dDepartment of Crop Protection, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

^eDepartment of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

^fFranciscan University, Santa Maria, RS, Brazil;

^gClinical Immunogenetics Laboratory, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

ABSTRACT

Richardia brasiliensis is a species used in folk medicine and rich in active compounds. In this study, the extracts were submitted to UHPLC-ESI-MS/MS analysis and total polyphenols, tannins, and flavonoids assays. Besides, it was determined its antioxidant capacity, oxidative stress markers and toxicological profile. Fourteen polyphenols were found and, in the dosages, a slight change in the concentrations in each extract was observed. Regarding the antioxidant capacity, the responses were different in the methods used. There was an increase in lipid peroxidation, and NO, however total ROS remained unchanged. The cells remained more than 90% viable and the extracts did not cause damage to single strands of DNA, with the exception of the crude autumn and spring extracts at 500 µg/mL. The results found in this study suggest that extracts are potentially toxic to human leukocyte cells in high concentrations; however, more studies should be performed in different cell lines.

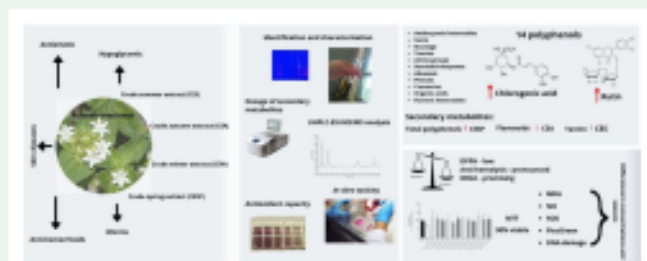
ARTICLE HISTORY

Received 19 December 2021

Accepted 18 May 2022

KEYWORDS

Richardia brasiliensis;
 Rubiaceae; poaia branca;
 phytochemical profile;
 biological activity;
 polyphenols



CONTACT Rafaela Castro Dornelles rafacdornelles@gmail.com

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://dx.doi.org/10.1080/14786419.2022.2081850>.

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

ANEXO IV – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO (ARTIGO II)

Regulatory Toxicology and Pharmacology 133 (2022) 105221



Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yrtph

Richardia brasiliensis Gomes: phytochemical characterization, antiproliferative capacity and *in vitro* and *in vivo* toxicity

Rafaela Castro Dornelles^{a,*}, Camille Gaube Guex^a, Rachel de Lima^b,
 Daniele Rubert Nogueira-Librelo^c, Rosana Casoti^d, Ana Martiele Engelmann^e,
 Camila Benaduce Emanuelli Mello^e, Julia Brandt de Souza^a, Cinthia Melazzo de Andrade^e,
 Alencar Kolinski Machado^f, Micheli Mainardi Pillat^g, Melânia Palermo Manfron^{b,c},
 Liliâne de Freitas Bauermann^{a,b}

^a Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^b Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^c Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^d Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^e Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^f Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

^g Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Martin Van den berg

Keywords:

Poaia-branca
 Rubiaceae
 Medicinal plant
 Active substances
 Phytochemical analysis
 Biological activity
 Antiproliferative
 Toxicity
In vitro test
 Animal model

ABSTRACT

Richardia brasiliensis, known as *poaia branca*, is a medicinal species widely distributed throughout Brazil and used in folk medicine. However, studies on its toxicity are practically non-existent, and little is known about its biological activity. This study aimed to investigate its phytochemical compounds, assess its *in vitro* and *in vivo* toxicities, and determine its antiproliferative activity. UHPLC-ESI-HRFTMS performed the phytochemical characterization, and the antiproliferative activity was analyzed in different tumor cell lines. *In vitro* toxicity was evaluated in PBMC cells, and *in vivo* acute and repeated dose toxicity was evaluated according to OECD guidelines. It was identified alkaloids and terpenes as significant compounds. Regarding its antiproliferative activity, the human melanoma strain decreased its viability by about 95%. *In vitro* toxicity showed that the extracts maintained the viability of PBMCs; however, higher concentrations were able to increase the production of dsDNA quantity. *In vivo* tests showed no mortality nor signs of toxicity; the alterations found in hematological and biochemical parameters are within the standards for the species. The results indicate that *R. brasiliensis* has a good effect against the tumor cell line; still, more studies on its toxicity at higher concentrations are needed.