

Avaliação da citotoxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos

Assessment of the cytotoxicity of coumarin-3-carboxylic acid in human erythrocytes

Evaluación de la citotoxicidad del ácido 3-cumarino carboxílico en eritrocitos humanos

Recebido: 05/05/2022 | Revisado: 17/05/2022 | Aceito: 20/05/2022 | Publicado: 26/05/2022

Humberto de Carvalho Aragão Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2264-2966>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: netohumberto@outlook.com

Aleson Pereira de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3430-477X>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: aleson_155@hotmail.com

Maria Alice Araújo de Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5563-7955>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: medeirosalice22@gmail.com

Millena de Souza Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7981-7608>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: millenaasouzaa@gmail.com

Reinaldo Nóbrega de Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4430-8202>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: reinaldoan@uol.com.br

Abrahão Alves de Oliveira Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7466-9933>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: abrahao.farm@gmail.com

Resumo

O eritrócito é um tipo celular altamente suscetível peroxidação lipídica e hemólise. Testes *in vitro* de citotoxicidade são frequentemente usados para rastrear e determinar a toxicidade de vários compostos, principalmente para investigar efeitos diretos sobre a integridade da membrana. As cumarinas (1,2-benzopirona) fazem parte de um grupo de compostos heterocíclicos presentes em várias famílias de plantas. Inúmeras atividades biológicas têm sido demonstradas para cumarinas e seus derivados, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e antimicrobianas. O objetivo do presente estudo foi investigar pela primeira vez o perfil tóxico de um derivado cumarínico, o ácido 3-cumarino carboxílico, em ensaios citotoxicidade envolvendo eritrócitos humanos. Foram preparadas soluções contendo o ácido 3-cumarino carboxílico nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 µg/mL. Amostras de sangue humano do tipo A, B e O foram coletadas de voluntários saudáveis e submetidas à avaliação de citotoxicidade frente aos ensaios de atividade hemolítica e anti-hemolítica. A substância testada foi capaz de reduzir a lise sobre os eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O em todas as concentrações testadas. No ensaio de fragilidade osmótica o ácido 3-cumarino carboxílico também foi capaz de proteger os eritrócitos humanos contra a hemólise, nos tipos sanguíneos A, B e O, nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL. Os resultados de citotoxicidade *in vitro* indicam que o ácido 3-cumarino carboxílico apresentou baixo percentual de hemólise para eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O quando em contato direto com essas células, sendo também capaz de proteger a membrana eritrocitária, impedindo a hemólise.

Palavras-chave: Hemólise; Fragilidade Osmótica; Testes de Toxicidade.

Abstract

The erythrocyte is a cell type that is highly susceptible to lipid peroxidation and hemolysis. In vitro cytotoxicity tests are often used to screen and determine the toxicity of various compounds, primarily to investigate direct effects on membrane integrity. Coumarins (1,2-benzopyrone) are part of a group of heterocyclic compounds present in several plant families. Numerous biological activities have been demonstrated for coumarins and their derivatives, including anti-inflammatory, antioxidant, anticancer and antimicrobial properties. The aim of the present study was to investigate for the first time the toxic profile of a coumarin derivative, 3-coumarin carboxylic acid, in cytotoxicity assays involving human erythrocytes. Solutions containing 3-coumarin carboxylic acid at concentrations of 50, 100, 500 and 1000 µg/mL were prepared. Human blood samples of types A, B and O were collected from healthy volunteers and submitted to cytotoxicity assessment in the face of hemolytic and anti-hemolytic activity assays. The

tested substance was able to reduce lysis on human erythrocytes of blood types A, B and O at all concentrations tested. In the osmotic fragility assay, 3-coumarin carboxylic acid was also able to protect human erythrocytes against hemolysis, in blood types A, B and O, at concentrations of 50µg/mL and 100µg/mL. The in vitro cytotoxicity results indicate that 3-coumarin carboxylic acid showed a low percentage of hemolysis for human erythrocytes of blood groups A, B and O when in direct contact with these cells, being also able to protect the erythrocyte membrane, preventing hemolysis.

Keywords: Hemolysis; Osmotic Fragility; Toxicity Tests.

Resumen

El eritrocito es un tipo de célula que es altamente susceptible a la peroxidación lipídica y la hemólisis. Las pruebas de citotoxicidad in vitro a menudo se utilizan para detectar y determinar la toxicidad de varios compuestos, principalmente para investigar los efectos directos sobre la integridad de la membrana. Las cumarinas (1,2-benzopirona) forman parte de un grupo de compuestos heterocíclicos presentes en varias familias de plantas. Se han demostrado numerosas actividades biológicas para las cumarinas y sus derivados, incluidas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas. El objetivo del presente estudio fue investigar por primera vez el perfil tóxico de un derivado de la cumarina, el ácido carboxílico de la 3-cumarina, en ensayos de citotoxicidad en eritrocitos humanos. Se prepararon soluciones que contenían ácido carboxílico 3-cumarina en concentraciones de 50, 100, 500 y 1000 µg/mL. Se recolectaron muestras de sangre humana de los tipos A, B y O de voluntarios sanos y se sometieron a evaluación de citotoxicidad frente a ensayos de actividad hemolítica y antihemolítica. La sustancia probada fue capaz de reducir la lisis en los eritrocitos humanos de los tipos de sangre A, B y O en todas las concentraciones probadas. En el ensayo de fragilidad osmótica, el ácido carboxílico 3-cumarina también fue capaz de proteger los eritrocitos humanos contra la hemólisis, en los tipos de sangre A, B y O, en concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL. Los resultados de citotoxicidad in vitro indican que el ácido carboxílico 3-cumarínico mostró un bajo porcentaje de hemólisis para los eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O al estar en contacto directo con estas células, pudiendo además proteger la membrana del eritrocito, previniendo la hemólisis.

Palabras clave: Hemólisis; Fragilidad Osmótica; Ensayos de Toxicidad.

1. Introdução

O eritrócito é um tipo de célula que contém altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, oxigênio molecular e íons ferrosos no estado ligante (Niki et al., 1991). Por esta razão, pode-se esperar que seja altamente vulnerável a reações envolvendo radicais livres, e pode ser muito suscetível peroxidação lipídica e hemólise (Brandão et al., 2005; Schiar et al., 2007). De especial importância, eritrócitos fornecem um modelo simples para estudar a proteção ou efeito tóxico de uma grande variedade de substâncias (Muñoz-Castañeda et al., 2006; Schiar et al., 2007; Sousa et al., 2021).

Os eritrócitos representam o principal componente na circulação sanguínea. Eles constituem um modelo celular fundamental para estudar potenciais interações do sangue com agentes químicos e farmacológicos. Alterações morfológicas, ruptura da integridade da membrana eritrocitária, e subsequente hemólise podem ser usadas para determinar a citotoxicidade de vários compostos. Além disso, os eritrócitos podem ser usados como um modelo celular na investigação de estresse oxidativo gerado por certas doenças ou xenobióticos, uma vez que as células vermelhas estão permanentemente sujeitas ao estresse oxidativo (Podsiedlik et al., 2020).

A membrana eritrocitária é uma estrutura complexa, semifluida e dinâmica que consiste em componentes lipídicos associados a proteínas com diversas funções. A membrana eritrocitária possui 19,5% (p/p) de água, 39,5% de proteínas, 35,1% de lipídios e 5,8% de carboidratos (de Oliveira & Saldanha, 2010). Os eritrócitos participam de inúmeras funções fisiológicas, entre as quais o transporte de gases (oxigênio, dióxido de carbono) do pulmão para os tecidos desempenha um papel primordial. Além disso, danos diretos à integridade eritrocitária, manifestando-se com hemólise, demonstrou contribuir essencialmente para patologias graves. Estas células, particularmente sua membrana, constituem um bom indicador da condição de saúde do indivíduo (Pretorius et al., 2016). Levando em consideração que muitas doenças são causadas pela inflamação, o estresse oxidativo em conjunto com a expressão de citocinas pró-inflamatórias contribuem para alterações bioquímicas na membrana e, conseqüentemente, levam a alterações na sua forma (Pretorius & Kell, 2014). Por fim, a

hemólise, que é caracterizada por danos celulares e extravasamento de hemoglobina devido a fatores mecânicos, alterações no equilíbrio ácido/base, pressão osmótica ou xenobióticos, é um fator limitante para o sucesso terapêutico ou desenvolvimento de novas drogas (Sousa et al., 2020).

Testes *in vitro* de citotoxicidade, realizados em eritrócitos, são frequentemente usados para rastrear e determinar a toxicidade de vários compostos (Markowicz-Piasecka et al., 2018; Sousa, Ferreira, et al., 2021). Grande parte dos estudos avaliam a interação direta de vários compostos químicos com essas células. Ensaio hemolítico realizado com eritrócitos humanos são amplamente utilizados para examinar a toxicidade de um xenobiótico, principalmente para investigar efeitos diretos sobre a integridade da membrana. Geralmente, os eritrócitos são escolhidos por possuírem apenas uma membrana e não apresentarem organelas. Esses dois fatores os tornam particularmente adequados para o estudo básico interações de compostos químicos com membranas celulares (Podsiedlik et al., 2020).

As cumarinas (1,2-benzopirona) fazem parte de um grupo de compostos heterocíclicos presentes em várias famílias de plantas. Eles fundiram anéis de benzeno e α -pirona que estão presentes em quantidades específicas nas plantas (Barot et al., 2015). Aproximadamente 3.560 derivados cumarínicos foram identificados e isolados de plantas (Jia, 2003). Inúmeras atividades biológicas têm sido demonstradas para cumarinas e seus derivados, incluindo propriedades anti-inflamatórias (Kalkhambkar et al., 2008), antioxidantes (Tyagi et al., 2005), anticancerígenas (Lee et al., 2008) e antimicrobianas (Borges et al., 2005). Moléculas contendo compostos fenólicos possuem alta capacidade antioxidante e podem ser utilizadas como candidatas a fármacos (Shah et al., 2014). Assim, são necessários estudos para descobrir novos medicamentos que possam ser testados com segurança em pesquisas clínicas (Gomes Júnior et al., 2020). No presente estudo, tentamos caracterizar o potencial citotóxico de uma nova cumarina sintética.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar pela primeira vez o perfil tóxico de um derivado cumarínico, o ácido 3-cumarino carboxílico, em ensaios de citotoxicidade envolvendo eritrócitos humanos.

2. Metodologia

2.1 Substância teste

O ácido 3-cumarínico carboxílico, foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Para os ensaios *in vitro*, foram utilizadas soluções contendo o ácido 3-cumarino carboxílico nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

2.2 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos referentes aos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de doadores saudáveis. Estes foram obtidos do Laboratório de Análises Clínicas - LABVITA. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciência da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

2.3 Análise da citotoxicidade em eritrócitos humanos

2.3.1 Avaliações da atividade hemolítica

Amostras de sangue humano A, B e O foram misturadas com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, o sedimento da última centrifugação ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% livre de componentes da série branca e plaquetas. Foi adicionado o ácido 3-cumarino carboxílico a 2 mL da suspensão de hemácias nas diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). Foi realizado o controle negativo (suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos - 0 % de hemólise) e o controle positivo (suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% - 100 % de hemólise). Após isso, as

amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Rangel et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados expressos como uma porcentagem que representa a média aritmética de três medidas.

2.3.2 Avaliação da atividade anti-hemolítica

A avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. As soluções contendo concentrações diferentes (50, 100, 500 e 1000 µg/mL) do ácido 3-cumarino carboxílico, foram incubadas em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo, as preparações são centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Os eritrócitos foram ressuspensos em solução hipotônica de cloreto de sódio 0,24% e agitadas a 100 rpm, por uma hora a 22 ± 2 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Dacie & Lewis, 2001). Foi realizado o controle negativo (suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos - 0 % de hemólise) e o controle positivo (suspensão de eritrócitos acrescida da solução hipotônica - 100 % de hemólise). Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados expressos como uma porcentagem que representa a média aritmética de três medidas.

2.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagens representando a média aritmética \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA) One-way e do teste post-hoc de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da atividade hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos

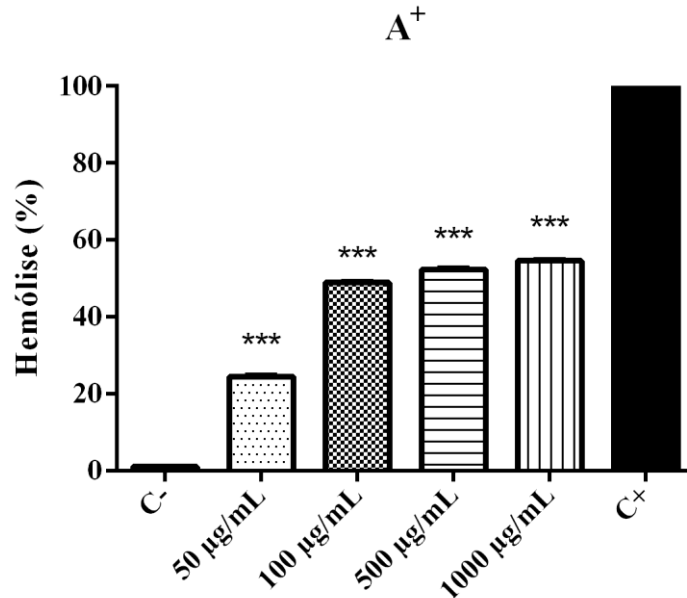
O presente estudo realizou o ensaio *in vitro* de citotoxicidade com eritrócitos humanos, visto que através desta análise torna-se possível avaliar os possíveis efeitos danosos do produto de origem natural à membrana dessas células.

A grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados faz a membrana eritrocitária ser considerada um valioso modelo biológico. Além disso, a presença de hemoglobina e numerosos sistemas antioxidantes os tornam um padrão adequado para testar o estresse oxidativo condições induzidas por xenobióticos (Farag & Alagawany, 2018).

A morte celular ou de tecidos pode ser ocasionada por substâncias de alto potencial citotóxico, cuja capacidade de modificar as absorções local e sistêmica facilitam a ocorrência de efeitos danosos ao indivíduo (Pereira et al., 2020). O efeito tóxico produzido por determinadas substâncias pode estar diretamente relacionado a altas capacidades hemolíticas, uma vez as hemácias são facilmente sensibilizadas por certas substâncias, promovendo lise e liberando hemoglobina (Sousa, Ferreira, et al., 2021). Este processo pode acarretar danos ao fígado, rins, coração e até o desenvolvimento de tumores (Schiari et al., 2007; Shiva Shankar Reddy et al., 2007).

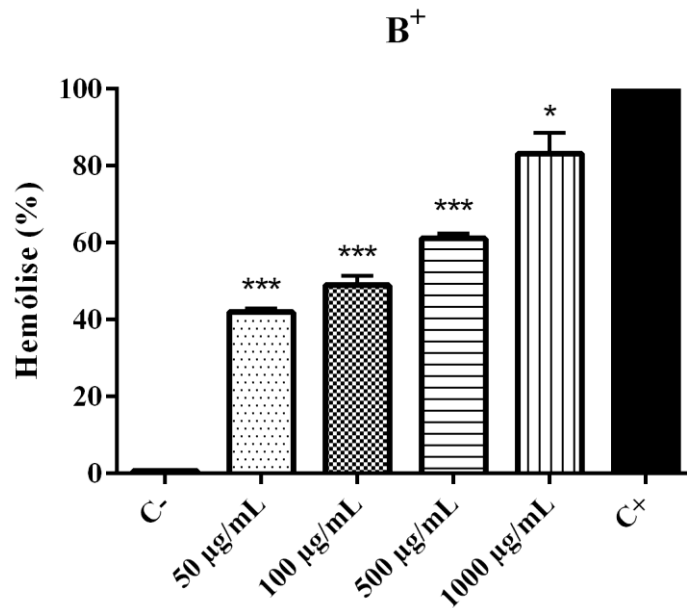
Para detectar a toxicidade inicial do ácido 3-cumarino carboxílico foi utilizada a metodologia de hemólise de eritrócitos, onde a substância testada foi capaz de reduzir a lise sobre os eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O em todas as concentrações testadas (50µg/mL, 100µg/mL, 500µg/mL e 1000µg/mL) quando comparados ao grupo controle positivo (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 1. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo A+ (positivo) induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. ***p < 0,001 versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo).



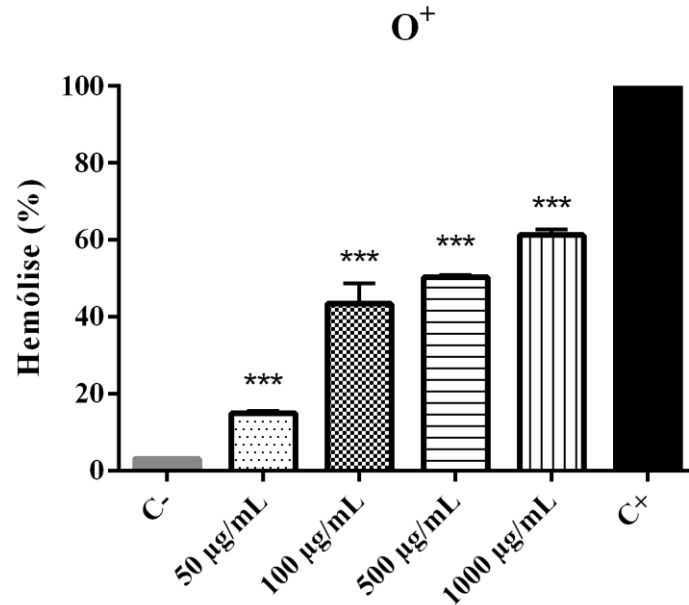
Fonte: Autores.

Figura 2. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo B+ (positivo) induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. ***p < 0,001 versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo).



Fonte: Autores.

Figura 3. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo O⁺ (positivo) induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. ***p < 0,001 versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo).

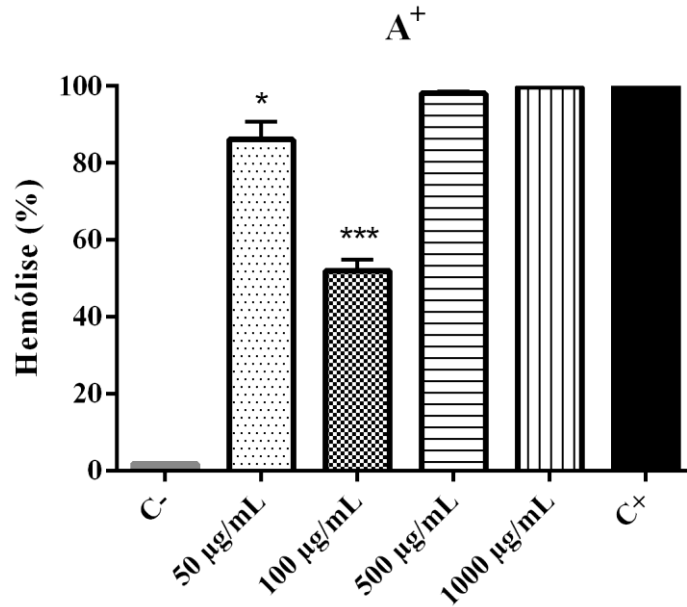


Fonte: Autores.

3.2 Avaliação da atividade anti-hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico

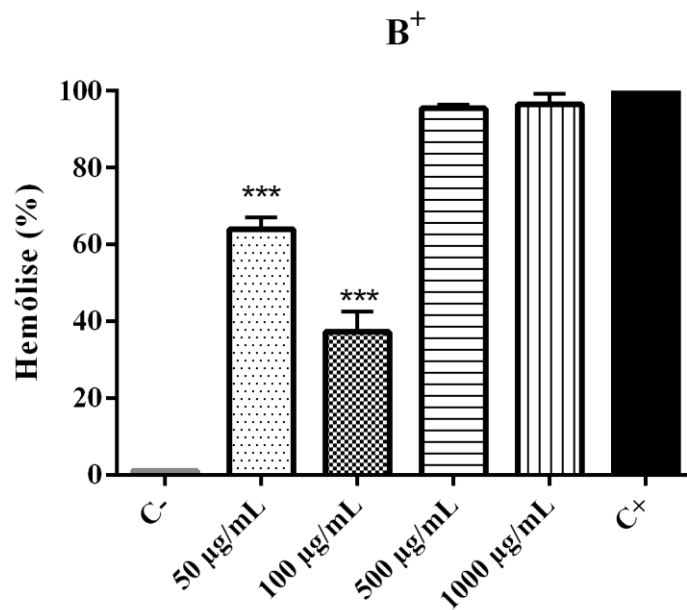
Em um segundo momento, foi realizado o teste anti-hemolítico para verificar o efeito do ácido 3-cumarino carboxílico sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos. Podemos observar que a substância testada, além de não hemolisar, também foi capaz de proteger os eritrócitos humanos contra a hemólise, nos tipos sanguíneos A, B e O, nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL, quando comparados ao grupo controle positivo (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo A+ (positivo) induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. ***p < 0,001 versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo).



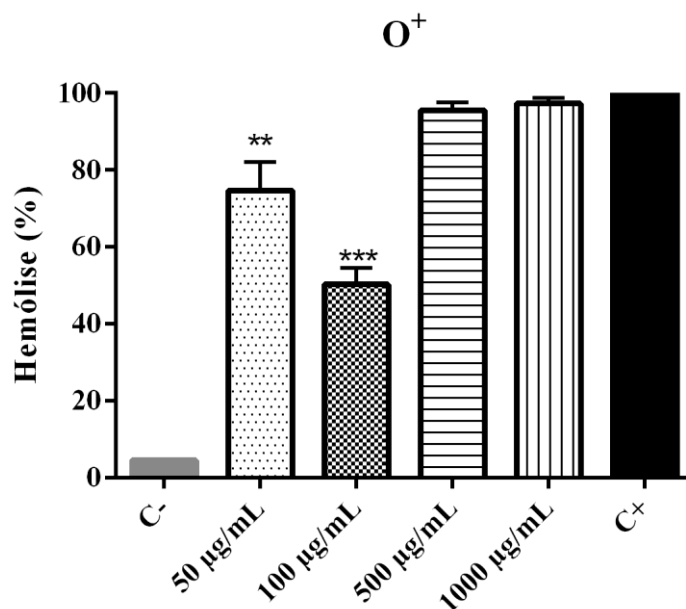
Fonte: Autores.

Figura 5. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo B+ (positivo) induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. ***p < 0,001 versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo).



Fonte: Autores.

Figura 6. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo O⁺ (positivo) induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. ***p < 0,001 versus grupo controle positivo. (C⁻: controle negativo; C⁺: controle positivo).



Fonte: Autores.

Zhang *et al.* testaram cinco 4-arilcumarinas e doze 3,4-dihidro-4-arilcumarinas para avaliar sua toxicidade em células da série vermelha. Eritrócitos de coelho foram usados como alvo para investigar a citotoxicidade dos dezessete derivados cumarínicos. Nenhum dos compostos mostraram forte citotoxicidade para a membrana eritrocitária. Na concentração de 100 µg/mL, a análise hemolítica mostrou que apenas dois compostos apresentaram atividade hemolítica com pouco mais de 5% de hemólise. Três compostos (200 mg/mL) apresentaram citotoxicidade muito fraca às hemácias e induziram menos de 3,82% de hemólise. E ainda, sete compostos não mostraram citotoxicidade detectável para eritrócitos, mesmo com concentração de 200 mg/mL (Zhang *et al.*, 2014).

A hemólise é considerada um importante teste de triagem na determinação da biocompatibilidade do composto. Um grau mais alto de hemólise leva à quebra maciça dos glóbulos vermelhos, e a compatibilidade do composto com o sangue diminui. Mukherjee *et al.* realizaram um estudo visando desvendar eventos celulares que ocorrem após a exposição de um novo derivado bioativo da 4-hidroxicumarina (4HBD) com células sanguíneas humanas. Relatos da literatura revelam que para aplicação eficaz de um composto o valor de hemólise deve ser inferior a 5%. A maioria das biscumarinas apresentam atividades hemolíticas praticamente inexistentes. Geralmente a cumarina e seus análogos possuem atividade anti-hemolítica muito boa. Na avaliação da atividade hemolítica, foi observado que o ensaio exibiu hemólise insignificante dos eritrócitos humanos quando em contato direto com o derivado de 4-hidroxicumarina (Mukherjee *et al.*, 2018).

Uma vez que a hemólise libera os produtos contidos no interior dos eritrócitos, as células neuronais ficam mais susceptíveis a sofrer impacto dos efeitos citotóxicos gerados por espécies reativas de oxigênio, cujo nível aumenta consideravelmente em virtude da liberação de ferro e hemoglobina (Podsiedlik *et al.*, 2020).

4. Considerações Finais

Os resultados *in vitro* de citotoxicidade indicam que o ácido 3-cumarino carboxílico apresentou baixo percentual de hemólise para eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O quando em contato direto com essas células. Ele também foi capaz de proteger a membrana eritrocitária, impedindo assim o rompimento da hemácia. Dessa forma, o ácido 3-cumarino carboxílico é capaz de reduzir em certo grau os efeitos citotóxicos gerados em decorrência do estresse oxidativo, sendo, portanto, uma opção promissora para a investigação de propriedades bioativas. Diante do exposto, esforços futuros devem envolver estudos *in vitro* de estresse oxidativo para compreender o mecanismo pelo qual o ácido 3-cumarino carboxílico promove seu efeito.

Referências

- Barot, K. P., Jain, S. V., Kremer, L., Singh, S., & Ghate, M. D. (2015). Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. *Medicinal Chemistry Research*, 24(7), 2771–2798. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1350-8>
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*, 12(8), 887–916. <https://doi.org/10.2174/0929867053507315>
- Brandão, R., Lara, F. S., Pagliosa, L. B., Soares, F. A., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., & Farina, M. (2005). Hemolytic Effects of Sodium Selenite and Mercuric Chloride in Human Blood. *Drug and Chemical Toxicology*, 28(4), 397–407. <https://doi.org/10.1080/01480540500262763>
- Dacie, J. V., & Lewis, S. M. (2001). Practical Haematology. *Harcourt Publishers Limited, 9th Editio*, 444–451.
- de Oliveira, S., & Saldanha, C. (2010). An overview about erythrocyte membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 44(1), 63–74. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1253>
- Farag, M. R., & Alagawany, M. (2018). Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>
- Gomes Júnior, A. L., Islam, M. T., Nicolau, L. A. D., de Souza, L. K. M., Araújo, T. de S. L., Lopes de Oliveira, G. A., de Melo Nogueira, K., da Silva Lopes, L., Medeiros, J.-V. R., Mubarak, M. S., & Melo-Cavalcante, A. A. de C. (2020). Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Properties of Anacardic Acid in Experimental Models. *ACS Omega*, 5(31), 19506–19515. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01775>
- Jia, Q. (2003). *Generating and Screening a Natural Product Library for Cyclooxygenase and Lipoxygenase Dual Inhibitors* (pp. 643–718). [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80016-9)
- Kalkhambkar, R. G., Kulkarni, G. M., Kamanavalli, C. M., Premkumar, N., Asdaq, S. M. B., & Sun, C. M. (2008). Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 2178–2188. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.08.007>
- Lee, S. H., Park, C., Jin, C.-Y., Kim, G.-Y., Moon, S.-K., Hyun, J. W., Lee, W. H., Choi, B. T., Kwon, T. K., Yoo, Y. H., & Choi, Y. H. (2008). Involvement of extracellular signal-related kinase signaling in esculetin induced G1 arrest of human leukemia U937 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(10), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.12.001>
- Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, K. M., Mikiciuk-Olasik, E., & Sikora, J. (2018). Biocompatible sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert beneficial effects on plasma haemostasis. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.005>
- Mukherjee, A., Ghosh, S., Sarkar, R., Samanta, S., Ghosh, S., Pal, M., Majee, A., Sen, S. K., & Singh, B. (2018). Synthesis, characterization and unravelling the molecular interaction of new bioactive 4-hydroxycoumarin derivative with biopolymer: Insights from spectroscopic and theoretical aspect. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 189, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.003>
- Muñoz-Castañeda, J., Muntané, J., Muñoz, M. C., Bujalance, I., Montilla, P., & Túnéz, I. (2006). Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. *Toxicology Letters*, 160(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.003>
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., & Sato, K. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 201S–205S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.1.201S>
- Pereira, C. T., Pereira, M. E. T., Simão, K. de L. A., Alves, M. de S., Simão, B. de L. A., Medeiros, M. A. A. de, Teles, Y. C. F., Anjos, R. M. dos, Oliveira, H. M. B. F. de, Oliveira, V. F. de, Medeiros, C. I. S., Sousa, A. P. de, & Oliveira Filho, A. A. de. (2020). Análise da citotoxicidade do extrato metanólico de Psidium guineense Swartz em células sanguíneas humanas. *Research, Society and Development*, 9(6), e61963093. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i6.3093>
- Podsiedlik, M., Markowicz-Piasecka, M., & Sikora, J. (2020). Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. *Chemico-Biological Interactions*, 332, 109305. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109305>
- Pretorius, E., & Kell, D. B. (2014). Diagnostic morphology: biophysical indicators for iron-driven inflammatory diseases. *Integr. Biol.*, 6(5), 486–510. <https://doi.org/10.1039/C4IB00025K>
- Pretorius, E., Olumuyiwa-Akeredolu, O. O., Mbotwe, S., & Bester, J. (2016). Erythrocytes and their role as health indicator: Using structure in a patient-orientated precision medicine approach. *Blood Reviews*, 30(4), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.01.001>

- Rangel, M., Malpezzi, E. L. A., Susini, S. M. M., & De Freitas, J. (1997). Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*, 35(2), 305–309. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00148-1)
- Schiar, V. P. P., dos Santos, D. B., Lüdtke, D. S., Vargas, F., Paixão, M. W., Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. (2007). Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.006>
- Shah, S. M. M., Sadiq, A., Shah, S. M. H., & Ullah, F. (2014). Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 181. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-181>
- Shiva Shankar Reddy, C. S., Subramanyam, M. V. V., Vani, R., & Asha Devi, S. (2007). In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1355–1364. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>
- Sousa, A. P., Fernandes, D. A., Ferreira, M. D. L., Cordeiro, L. V., Souza, M. F. V., Pessoa, H. L. F., Oliveira Filho, A. A., & Sá, R. C. S. (2020). Analysis of the toxicological and pharmacokinetic profile of Kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaryl) glucopyranoside - Tiliroside: in silico, in vitro and ex vivo assay. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.244127>
- Sousa, A. P., Oliveira, M. S., Fernandes, D. A., Ferreira, M. D. L., Cordeiro, L. V., Souza, M. F. V., Fernandes, L. M. D., Souza, H. D. S., Oliveira Filho, A. A., Pessoa, H. L. F., & Sá, R. C. S. (2021). In silico, in vitro, and ex vivo studies of the toxicological and pharmacological properties of the flavonoid 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(10). <https://doi.org/10.1590/1414-431x2021e11203>
- Sousa, A. P. de, Ferreira, M. D. L., Fernandes, D. A., Cordeiro, L. V., Souza, M. de F. V. de, Pessoa, H. de L. F., Oliveira, A. A. de, & Sá, R. de C. da S. e. (2021). In silico, in vitro and ex-vivo Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8 -C-β-Glucopyranoside - Vitexin. *Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicadas - RCFBA*, 42. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0709>
- Tyagi, Y. K., Kumar, A., Raj, H. G., Vohra, P., Gupta, G., Kumari, R., Kumar, P., & Gupta, R. K. (2005). Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(4), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.09.002>
- Zhang, K., Ding, W., Sun, J., Zhang, B., Lu, F., Lai, R., Zou, Y., & Yedid, G. (2014). Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. *Biochimie*, 107, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.014>