

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Avaliação da toxicidade aguda, potenciais genotóxicos, imunomodulatórios
e investigação dos efeitos anti-hiperglicêmicos do infuso liofilizado das
folhas de *Aristolochia triangularis* Cham.**

FLÁVIO HENRIQUE SOUZA DE ARAÚJO

Dourados – MS

2021

FLÁVIO HENRIQUE SOUZA DE ARAÚJO

Avaliação da toxicidade aguda, potenciais genotóxicos, imunomodulatórios e investigação dos efeitos anti-hiperglicêmicos do infuso liofilizado das folhas de *Aristolochia triangularis* Cham.

Áreas do CNPQ: Ciências da Saúde:
04.00.00.00-1.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Silvia Aparecida Oesterreich

Dourados – MS

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A663a Araujo, Flavio Henrique Souza De

Avaliação da toxicidade aguda, potenciais genotóxicos, imunomodulatórios e investigação dos efeitos anti-hiperglicêmicos do infuso liofilizado das folhas de *Aristolochia triangularis* Cham. [recurso eletrônico] / Flavio Henrique Souza De Araujo. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Silvia Aparecida Oesterreich.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Cipó-de-mil-homens. 2. DL50. 3. *Drosophila melanogaster*. 4. teste Ames. 5. TOTG. I. Oesterreich, Silvia Aparecida. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.




UFPGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR **FLÁVIO HENRIQUE SOUZA DE ARAÚJO**, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “FARMACOLOGIA”.

Aos vinte e nove dias do mês de julho de dois mil e vinte e um, às 14 horas, em sessão pública, realizou-se por videoconferência a Defesa de Tese de Doutorado intitulada “**Avaliação da toxicidade aguda, potencial genotóxico, mutagênico e investigação dos efeitos anti-hiperglicêmicos do infuso liofilizado das folhas de *Aristolochia triangularis* CHAM**” apresentada pelo aluno **Flávio Henrique Souza de Araújo**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Silvia Aparecida Oesterreich - PPGCS/UFPGD (presidente), Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo - PPGCS/UFPGD, Dr.^a Karine de Cássia Freitas/UFMS, Dr.^a Raquel dos Santos Donatini/UFPGD e Dr.^a Juceli Gonzalez Gouveia/UEMS. Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após o candidato ter apresentado a sua explanação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO, fazendo *jus* ao título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. **A presidente da banca abaixo assinado atesta que todos os membros participaram de forma remota¹ desta defesa de tese, considerando o candidato APROVADO, conforme declarações anexas**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pela presidente da Comissão Examinadora.

Dourados, 29 de julho de 2021.

Dr.^a Silvia Aparecida Oesterreich - PPGCS/UFPGD 
Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo - PPGCS/UFPGD (participação remota)
Dr.^a Karine de Cássia Freitas/UFMS (participação remota)
Dr.^a Raquel dos Santos Donatini/UFPGD (participação remota)
Dr.^a Juceli Gonzalez Gouveia/UEMS (participação remota)

¹ Participação remota dos membros da banca conforme § 3º do Art. 1º da Portaria RTR/UFPGD n. 200, de 16/03/2020 e Art. 2º e 5º da Instrução Normativa PROPP/UFPGD N° 1, de 17/03/2020

ATA HOMOLOGADA EM: ____ / ____ / ____, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFPGD.

Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa
Assinatura e Carimbo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha orientadora, ao Grupo de Pesquisa em Biologia Aplicada à Saúde e aos técnicos da FCS-UFMG pelo apoio contínuo.

Em especial à minha família, por estarem incansavelmente ao meu lado e conhecerem não somente minha força de vontade, mas por entenderem meu coração. Amo vocês!

Quando O Fogo Passa na floresta todos correm...

O Homem corre,

Os pássaros voam para outro abrigo,

E até o leão, mais forte, dominador,

e temido da floresta também corre.

A única que não corre é a árvore.

O fogo pergunta para árvore:

- Árvore, todos correram e você não vai correr?

A árvore responde:

- Eu sou árvore plantada por Deus.

Você passará por mim, queimara os meus frutos e folhas.

Mas...dentro de alguns meses eu volto a florescer.

Porque a minha raiz você não queimará.

Minhas folhas, galhos e frutos novamente aparecerão.

Pois a árvore que Deus planta ninguém arranca.

"Deus Te Sustentará Em Toda Sua Vida Nessa Terra.

Venha o fogo que vier, fica firme.

Pois Você é uma árvore plantada por Deus".

Então não importa a situação que você esteja passando;

Suas raízes estão firmadas naquele que tudo pode.

(Desconhecido)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Visão geral da <i>Aristolochia triangularis</i>	26
Figura 2. <i>A. triangularis</i> – flores em destaque.....	27
Figura 3. <i>A. triangularis</i> – folhas em destaque.....	27
Figura 4: Lignanas identificadas provisoriamente ou definitivamente no infuso das folhas de <i>A. triangularis</i>	29
Figura 5: Lignanas e outros compostos identificadas provisoriamente ou definitivamente no infuso das folhas de <i>A. triangularis</i>	29
Figura 6: Alcaloides e outros compostos nitrogenados identificados provisoriamente no infuso de <i>A. triangularis</i>	30
Figura 7: Flavonoides e outras substâncias identificados (provisoriamente) no infuso das folhas de <i>A. triangularis</i>	30
Figura 8. Esquema da interação dos ácidos aristolóquicos com moléculas do DNA.....	33
Figura 9. Estrutura básica de um flavonoide	33
Figura 10. Hiperglicemia crônica e suas complicações.....	42
Figura 11. Células submetidas a solução de lise e corrida de eletroforese.	58
Figura 12. DNA após exposição a eletroforese, com estrutura subdividida em nucleóide intacto e cauda em tamanho proporcional às lesões gênicas.....	59
Figura 13. Eritrócitos extraídos da medula óssea, submetidos a coloração por Giemsa.....	61
Figura 14. Eritrócito policromático micronucleado no sangue periférico.....	61

Figura 15. <i>Drosophila melanogaster</i> , porção em destaque indicando o apêndice sexual de machos separados com auxílio de microscópio estereoscópio binocular (Lupa)	63
Figura 16. <i>Drosophila melanogaster</i> , porção em destaque indicando o apêndice sexual de fêmeas separadas com auxílio de microscópio estereoscópio binocular (Lupa).....	63
Figura 17. Superfície da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , dividida em setores de A, B, C, D e E.....	64
Figura 18. Fragmento do setor A e B na superfície da asa, manchas gêmeas com pelos <i>flr³</i> e tricomas <i>mwh</i>	64
Figura 19. Caracterização das linhagens de <i>D. melanogaster</i> , morfologia da asa; estrutura do par de cromossomos 3, com posição dos genes mutantes; e características dos pelos das linhagens <i>mwh</i> (A), <i>flr³</i> (B) e <i>ORR/flr³</i>	65
Figura 20. Fotografias de pares de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	66
Figura 21. Leucócitos e hemácias do sangue periférico; A – linfócito; B- neutrófilo; C- eosinófilo; D- linfócito e monócito; E e F- neutrófilos.....	69
Figura 22. Leitura de fagocitose.....	71
Figura 23. Ensaio de apoptose de células do fígado.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da espécie <i>Aristolochia triangularis</i>	24
Tabela 2. Critérios diagnósticos para o diabetes.....	40
Tabela 3. Critérios diagnósticos para o pré-diabetes e para risco aumentado de diabetes.....	41
Tabela 4. Classificação de substâncias baseada em critérios do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de produtos químicos após o teste de toxicidade oral aguda.....	51
Tabela 5. Diretrizes da OECD e princípios norteadores para a avaliação de toxicidade oral aguda.....	52
Tabela 6. Parâmetros do <i>screening</i> hipocrático proposto por Malone e Robichau (1962).....	53

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Tratamento de ratos normais hiperglicêmicos – Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG).....	45
Fluxograma 2. Determinação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático.....	46
Fluxograma 3. Determinação da atividade das dissacaridases intestinais.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácidos Aristolóquicos
ADA	Associação Americana de Diabetes
AL	Aristolactamas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
ATC	Método de Toxicidade Aguda de Classe
CAT	Catalase
CL-EM	Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa
DAB	Departamento de Atenção Básica
DG	Diabetes Gestacional
DI	Diabetes Insipidus
DL ₅₀	Dose Letal Mediana
DM	Diabetes Melito
DM1	Diabetes Melito tipo 1
DM2	Diabetes Melito tipo 2
DMID	Diabetes Melito Insulino-Dependente
DMNID	Diabetes Melito não Insulino-Dependente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (Administração de Alimentos e Drogas)
FDP	Teste de Dose Fixa
flr ³	Flare
g	<i>Gram</i> (Gramma)
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
GIP	Peptídeo Inibidor Gástrico
Glicose-1P	Glicose 1-fosfato
Glicose-6P	Glicose 6-fosfato
GLUTs	Transportadores de Glicose
GLUT2	Transportador de Glicose 2
GLUT4	Transportador de Glicose 4
GS	Glicogênio Sintase
HB	Alta Bioativação
(his-)	Histidina
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano
Inf-L	Infuso Liofilizado
Inf-L-At	Infuso Liofilizado de <i>Aristolochia triangularis</i>
i.p	intraperitoneal
K _{ATP}	Potássio sensível ao ATP
kg	<i>Kilogram</i> (Quilograma)
mg	<i>Milligram</i> (Miligrama)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de histocompatibilidade)

mL	<i>Mililiter</i> (Mililitro)
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MNPCEs	<i>Micronucleated Polychromatic Erythrocytes</i> (Eritrócitos Policromáticos Micronucleados)
MS	Ministério da Saúde
MWH	<i>Multiple Wing Hairs</i> (Tricomas Múltiplos na Asa)
n=	número/quantidade
NCEs	<i>Normochromic Erythrocytes</i> (Eritrócitos Normocromáticos)
NK	<i>Natural Killer Cell</i> (Células exterminadoras naturais ou células NK)
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> (Organização para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORR	<i>Oregon R flare</i>
PBMCs-	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células Mononucleares de Sangue Periférico)
p.c.	peso corpóreo
PCEs	<i>Polychromatic Erythrocytes</i> (Eritrócitos Policromáticos)
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i> (Receptor de Tirosina Quinase)
SCGE	<i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Células Individualizadas)
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i> (Teste de Mutação e Recombinação Somáticas)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SOD	Superóxido Redutase
ST	Cruzamento Padrão
SUS	Sistema Único de Saúde
SUR:	Receptor de sulfonilureias
SVS/MS	Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
TM3, Bd ^S	<i>Third Multiple 3, beaded-serrate</i> (Terceiro múltiplo de três, bordas serrilhadas)
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
UDP	Teste “Up and Down”
UDP-G	Uridina-difosfato Glicose Pirofosforilase
VP	Vasopressina
v.o	Via oral
μL	Microlitro

Avaliação da toxicidade aguda, potenciais genotóxicos, imunomodulatórios e investigação dos efeitos anti-hiperglicêmicos do infuso liofilizado das folhas de *Aristolochia triangularis* Cham.

RESUMO

O Cerrado brasileiro é considerado um *hotspot* mundial. Apesar de muitas espécies vegetais serem utilizadas na alimentação, na prevenção e no tratamento de diversas doenças, sabe-se que somente o uso empírico não é suficiente para validar a segurança de uma planta. Dessa forma, estudos de toxicidade em associação a estudos farmacológicos são necessários para avaliar os possíveis efeitos adversos e garantir a segurança do uso. Além disso, podem elucidar os potenciais medicinais e farmacológicos das plantas dos biomas brasileiros, possibilitando, futuramente, a descrição de fitoterápicos e a síntese e prospecção de novos fármacos. Dentre as plantas de uso popular, a *Aristolochia triangularis*, conhecida popularmente como “cipozinho-prá-diabetes” e com ocorrência comum nas regiões Sul e Centro-Oeste, é uma das 92 *Aristolochia* spp. catalogadas no Brasil até o momento. Sua relevância para o estudo se justifica pelo histórico considerável de utilização da espécie vegetal na medicina popular para o tratamento de diabetes, sendo também indicada para o tratamento de reumatismo, infecções e feridas de pele. O órgão vegetal de *A. triangularis* utilizado para tratar diabetes é a folha, cujo consumo ocorre na forma de chá, obtido pelo método de infusão. E, apesar de tal uso popular da espécie, não existem registros de estudos no Brasil que validem o uso seguro do infuso das folhas e que corroborem suas propriedades farmacológicas. Neste sentido, o objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda, estimar a dose letal mediana (DL50) em ratas tratadas com a infusão liofilizada (Inf-L) das folhas de *A. triangularis* na dose de (2000 mg/kg). Posteriormente, foi avaliado o potencial mutagênico do Inf-L nas doses de (0,62, 1,25; 2,5; 5mg/mL) em teste Ames e pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) usando os Cruzamentos Padrão (ST) e de Alta Bioativação (HB) em asas de *Drosophila melanogaster*. Para os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo*, foram utilizados 50 ratos Wistar de ambos os sexos, subdivididos em cinco grupos experimentais (5 animais de cada sexo): os animais do grupo controle negativo foram tratados com 1 mL de veículo via oral (v.o); três grupos Inf-L-At foram tratados por v.o com doses de (62,5, 125 e 250 mg/kg p.c, v.o); e o grupo controle positivo recebeu via intraperitoneal (50 mg/kg p.c de ciclofosfamida). A bioatividade do Inf-L-At foi avaliada verificando o seu efeito na glicemia de 25 animais machos, normoglicêmicos e hiperglicêmicos em 5 tempos (0, 15, 30, 60 e 180 minutos), subdivididos em cinco grupos respectivamente: 1- Controle (Glicose 4000 mg/kg); 2- ((Glibenclamida (100

mg/kg) + (Glicose 4000 mg/kg)); e 3,4 e 5- ((Grupos Inf-L-At 62,5, 125 e 250 mg/kg) + (Glicose 4000 mg/kg)). Foram determinados a curva glicêmica e os efeitos do Inf-L-At no conteúdo de glicogênio hepático e muscular e na atividade das dissacaridasas (maltase, lactase e sacarase) intestinais. A DL50 foi estimada acima de 2000 mg/kg, sendo que o Inf-L-At não apresentou efeitos tóxicos a curto prazo, embora o peso absoluto do fígado e peso relativo dos rins, tenham se diferido significativamente do controle negativo. Ademais, pelo teste Ames, o Inf-L-At em diferentes concentrações foi mutagênico na linhagem TA100 com (S+) em fração microsomal, e indicou diagnóstico positivo para efeitos mutagênicos nas concentrações de 2.5 e 5.0 mg/mL, similarmente ao grupo DXR. *In vivo*, ratos de ambos os sexos, expostos as diferentes doses do Inf-L-At, foram genotóxicos, com recrutamento de linfócitos no baço, e aumento exponencial de fagocitose esplênica. Os ensaios de micronúcleos em sangue periférico e medula óssea, corroboram o potencial mutagênico atribuído ao Inf-L-At pelo teste Ames e teste SMART. E após 72 horas, as frequências de micronúcleos foram diminuídas. Estes resultados podem justificar-se pelo aumento de células em apoptose no fígado e rins de animais tratados com o composto nas respectivas doses. Pelo teste TOTG, o infuso apresentou ao longo do protocolo de avaliação redução significativa da curva glicêmica, similarmente a glibenclamida. Com aumento expressivo no conteúdo do glicogênio hepático, no entanto apesar dos efeitos anti-hiperglicêmicos observados pelo Inf-L-At nas condições e doses utilizadas, não há correlação com a atividade das dissacaridasas intestinais e glicogênio muscular, conforme resultados para o modelo. Conclui-se, que o extrato aquoso da infusão liofilizada das folhas de *A. triangularis* (Inf-L-At) não exibiu toxicidade aguda em ratos *Wistar*. No entanto, nas respectivas doses avaliadas, o Inf-L-At possui potencial à mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*, conforme descrito pelo teste Ames, teste de Micronúcleo e teste SMART. Além disso, constatou-se também potenciais efeitos hipoglicemiantes, similarmente a glibenclamida.

Palavras-chave: Cipó-de-mil-homens, DL50, *Drosophila melanogaster*, mutagênese, Teste Ames, TOTG.

Assessment of acute toxicity, genotoxicity potential, immunomodulatory and investigation of antihyperglycemic effects of lyophilized infuse *Aristolochia triangularis* leaves Cham.

ABSTRACT

The Brazilian Cerrado is considered a global hotspot. Although many plant species are used in food, prevention, and treatment of various diseases, it is known that empirical use alone is not enough to validate the safety of a plant. Thus, toxicity studies associated with pharmacological studies are necessary to evaluate the possible adverse effects and ensure safety for use. Also, they can elucidate the medicinal and pharmacological potentials of plants from Brazilian biomes, allowing, in the future, the description of phytotherapeutics and the synthesis and prospection of new drugs. Among the plants of popular use, *Aristolochia triangularis*, popularly known as "cipózinho-prá-diabetes" and a common occurrence in the south and mid-west regions, is one of the 92 *Aristolochia* spp. cataloged in Brazil so far. Its relevance to this study is justified by the considerable history of use of the plant species in folk medicine to treat diabetes. It is also indicated for the treatment of rheumatism, infections, and skin wounds. The plant organ of *A. triangularis* used to treat diabetes is the leaf, whose consumption is in tea, obtained by the infusion method. And despite such popular use of the species, there are no records of Brazil studies that validate any safe use of the leaf infusion and corroborate its pharmacological properties. In this sense, the research aimed to evaluate the acute toxicity, estimate the median lethal dose (LD50) in rats treated with the lyophilized infusion (Inf-L) of *A. triangularis* leaves at a dose of (2000 mg/kg). Subsequently, the mutagenic potential of Inf-L at doses of (0.62, 1.25; 2.5; 5mg/mL) was evaluated in Ames test and by Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) using Standard (ST) and High Bioactivation (HB) crosses in *Drosophila melanogaster* wings. For the *in vivo* genotoxicity and mutagenicity assays, 50 Wistar rats of both sexes were used, subdivided into five experimental groups (5 animals of each sex): the animals in the negative control group were treated with 1 mL of the vehicle via oral (v.o); three Inf-L-At groups were treated by v.o with doses of (62.5, 125, and 250 mg/kg b.w., v.o); and the positive control group received via intraperitoneal (50 mg/kg b.w. of cyclophosphamide). The bioactivity of Inf-L-At was evaluated verifying its effect on the blood glucose levels of 25 male animals, normoglycemic and hyperglycemic in 5 times (0, 15, 30, 60 and 180 minutes), subdivided into five groups respectively: 1- Control (Glucose 4000 mg/kg); 2- ((Glibenclamide (100 mg/kg) + (Glucose 4000 mg/kg)); and 3,4 and 5- ((Groups Inf-L-At 62.5, 125 and 250 mg/kg) + (Glucose 4000 mg/kg)). The glycemic curve and the effects of Inf-L-At on liver and muscle glycogen content and the activity of intestinal disaccharidases (maltase, lactase, and saccharase) were determined. The LD50 was estimated to be above 2000 mg/kg, and Inf-L-At showed no short-term toxic effects. However, the absolute liver weight and relative kidney weight differed significantly from the negative control. Furthermore, by the Ames test, Inf-L-At at different concentrations was mutagenic in strain TA100 with (S+) in microsomal fraction and indicated positive diagnosis for mutagenic effects at concentrations of 2.5 and 5.0 mg/mL, similarly to the DXR group. *In vivo*, rats of both sexes exposed to different doses of Inf-L-At were genotoxic, with recruitment of lymphocytes in the spleen, and an exponential increase in splenic phagocytosis. Micronucleus assays in peripheral blood and bone marrow corroborate Inf-L-At's mutagenic potential attributed to Inf-L-At by the Ames test and SMART test. And after 72 hours, the frequencies of micronuclei were decreased. These results may be justified by increasing apoptotic cells in the liver and kidneys of animals treated with the compound at the respective doses. By the TOTG test, the infusion showed a significant reduction in the glycemic curve throughout the evaluation protocol, similarly to glibenclamide.

However, despite the antihyperglycemic effects observed by Inf-L-At in the conditions and doses used, there is no correlation with the activity of intestinal disaccharides and muscle glycogen, according to the results for the model. It is concluded that the aqueous extract of the lyophilized infusion of *A. triangularis* leaves (Inf-L-At) did not exhibit acute toxicity in Wistar rats. However, at the respective doses evaluated, Inf-L-At has potential for mutagenicity in vitro and in vivo, as described by the Ames test, Micronucleus test, and SMART test. In addition, it also has potential hypoglycemic effects, similar to glibenclamide.

Keywords: Cipó-de-mil-homens, LD50, *Drosophila melanogaster*, mutagenesis, Ames test, OGTT.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Plantas medicinais e fitoterápicos.....	20
2.2. A família <i>Aristolochiaceae</i>	22
2.2.1. O gênero <i>Aristolochia</i> (<i>s.l</i>) e a espécie <i>A. triangularis</i>	24
2.2.2. Composição química e aspectos metabólicos.....	28
2.2.2.1. Ácidos aristolóquicos e aristolactamas.....	32
2.2.2.2. Compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.....	33
2.3. Homeostasia glicêmica.....	34
2.4. Diabetes melito.....	37
2.4.1. Aspectos gerais.....	37
2.4.2. Tipos de diabetes melito.....	38
2.4.3. Estudo de hiperglicemia e diabetes em modelos experimentais em ratos <i>Wistar</i>	43
2.4.3.1. Delineamento experimental do bioensaio de atividade anti-hiperglicêmica.....	44
2.4.3.1.1. Animais.....	44
2.4.3.1.2. Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	45
2.4.3.1.3. Medida do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, e atividade das dissacaridasas intestinais em ratos normoglicêmicos após o tratamento com diferentes doses do Inf-L <i>A. triangularis</i>	46
2.5. Toxicologia: ensaios pré-clínicos de plantas medicinais, produtos naturais e fitoterápicos.....	48
2.5.1. Toxicidade aguda.....	50
2.5.2. Delineamento experimental de toxicidade aguda.....	51
2.6. Toxicogenética.....	54
2.7. Ensaio biológicos.....	55
2.7.1. Teste de Ames.....	55
2.7.2. Ensaio do cometa.....	57
2.7.3. Ensaio de micronúcleo.....	59
2.7.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART).....	62
2.7.5. Ensaio imunomodulatórios.....	68
2.7.5.1. Contagem diferencial das células do sangue.....	69

2.7.5.2. Fagocitose esplênica	71
2.7.5.3. Apoptose.....	72
2.7.6 Delineamento experimental da toxicogenética e imunomodulação.....	74
3. OBJETIVO.....	73
3.1. Geral.....	73
3.2. Específicos.....	74
4. CONCLUSÕES.....	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
6. APÊNDICES	96
6.1. Artigo I: Phytochemical, pharmacological, and toxicological characteristics of the genus <i>Aristolochia</i> (s.l) and the species <i>A. triangularis</i>	96
6.2. Artigo II: Evaluation of the toxicity acute and toxicogenetic potential immunomodulatory of aqueous extract from <i>Aristolochia triangularis</i> leaves.....	122
6.3. Artigo III: Antihiperглиcemic potential and chemical constituents of <i>Aristolochia triangularis</i> (Cham.) leaves.....	181
7. ANEXOS.....	234
7.1. Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	235

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras plantas medicinais representam, por vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades. Em seu uso tradicional, são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades e sua utilização remete aos primórdios da humanidade até os tempos modernos, sendo objetos de estudo em diversas áreas, como fitoquímica, farmacognosia e farmacologia (MENDANHA et al., 2010).

Nas últimas décadas, o uso de plantas medicinais aumentou significativamente em várias regiões no mundo, seja como fitoconstituintes empregados na medicina tradicional ou como matéria-prima para a produção de alimentos (HARVEY, 2000; FRANÇA et al., 2007; ANVISA, 2014; 2020; BOAS et al., 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 70 e 80% da população mundial depende exclusivamente das plantas para tratamentos primários de saúde (CHAN, 2003; MUHAMMAD et al., 2011).

Paralelamente, apesar da existência de muitas metodologias para síntese de novos produtos farmacêuticos, as plantas e outros produtos naturais representam as principais fontes para pesquisa de novas identidades moleculares, principalmente por expressarem constituintes de difícil obtenção pela síntese química (HARVEY, 2000; KUSKOSKI et al., 2006; MUNARI et al., 2010; ROCHA, 2011). Ademais, os compostos obtidos a partir de fontes naturais também podem servir como protótipos para a produção de novos medicamentos com atividades biológicas e terapêuticas similares aos de uso corrente, ou então ser ligeiramente modificados para torná-los mais efetivos e/ou menos tóxicos (HARVEY, 2000; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; MUNARI et al., 2010; REGNER et al., 2011).

Embora séculos de uso tradicional de plantas medicinais por diversas populações sugerem segurança quanto ao uso, contrariamente aos medicamentos alopáticos, a toxicidade de órgãos vegetais ou até mesmo de medicamentos fitoterápicos tradicionais não foi completamente avaliada na maioria das espécies vegetais, o que oferece riscos à saúde humana (BRASIL, 2018; SOUSA; SANTOS; ROCHA, 2019). Este fato é corroborado por diversos estudos que relatam potencial genotóxico em plantas frequentemente utilizadas na medicina tradicional (MARQUES et al., 2003; ANANTHI; CHANDRA; SANTHIYA, 2010; MELO et al., 2011; REIS et al., 2011; SHIN et al., 2011).

Apesar do risco iminente à saúde, devido ao potencial tóxico desconhecido de muitos vegetais de uso popular, a utilização de plantas, consumidas principalmente na forma de chás, é frequentemente empregada no controle e tratamento de diversas doenças crônicas, incluindo o manejo de diabetes. Sendo esta prática difundida no mundo, com descrição de

aproximadamente 1.200 espécies vegetais com uso para fins terapêuticos (MARLES; FARNSWORTH, 1995; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

A título de outro exemplo, destaca-se o trabalho de Trojan-Rodrigues et al, (2012), os quais publicaram uma compilação de um total de 81 espécies vegetais, distribuídas em 42 famílias angiospérmicas, comumente empregadas como antidiabéticos na região sul do Brasil, em especial na medicina popular do Rio Grande do Sul (MARLES; FARNSWORTH, 1995; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

Inserida no contexto supracitado está a família Aristolochiaceae, constituída por quatro gêneros e aproximadamente 600 espécies distribuídas predominantemente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas no planeta (CAPELLARI JR 2001; NOGUEIRA, 2010; NOGUEIRA; LOPES, 2012). As Aristolochiaceae, especialmente aquelas dos gêneros *Aristolochia* e *Asarum*, são largamente utilizadas na medicina tradicional e homeopática, além disso, são utilizadas em rituais (WHO, 2004; NOGUEIRA; LOPES, 2012; NITZSCHE; MELZIG; ARLT, 2013). Além de serem utilizadas para o tratamento de diabetes, também há relatos de outras aplicações farmacológicas: i) câncer, ii) complicações gastrointestinais, iii) envenenamento e picadas de cobra, iv) malária e verminose e v) condições ginecológicas, dermatológicas, cardiovasculares e dos sistemas cardiovascular e nervoso central (HEINRICH et al., 2009).

A *Aristolochia triangularis* Cham. (Aristolochiaceae), conhecida popularmente como “cipózinho-prá-diabetes” e com ocorrência comum no Brasil, é uma das 92 *Aristolochia* spp., catalogadas no país até o momento. Ela possui um histórico considerável de utilização na medicina popular para o tratamento de diabetes, sendo também indicada para diversos outros propósitos medicinais, como o tratamento de reumatismo, infecções, doenças e feridas de pele (HEINRICH et al., 2009; PEREIRA et al., 2018; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012; VIBRANS et al., 2018).

Em 2019, o diabetes foi considerado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (PORTAL FIOCRUZ, 2019a; SBD, 2019a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas últimas décadas, houve aumento exponencial no número de casos de diabéticos (PORTAL FIOCRUZ, 2019a, 2019b). Desde 1980, o número de pessoas vivendo com a doença quadruplicou, alcançando, em 2014, alarmantes 422 milhões de casos e, em 2019 atingiu 463 milhões de pessoas. Possivelmente, tal crescimento está relacionado à prevalência da obesidade, aos maus hábitos alimentares e ao estilo de vida cada vez mais sedentário (DA CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017). Ademais, a taxa de mortalidade também tem crescido significativamente, porquanto níveis elevados de glicose representam um sério fator

de risco, por exemplo, para doenças cardiovasculares (CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017; PORTAL FIOCRUZ, 2019a; SBD, 2019a).

Tais dados alarmantes, por si só, justificam a necessidade crescente e urgente pela descoberta e pelo desenvolvimento de novos métodos terapêuticos, eficazes e seguros para tratar pacientes com diabetes (CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017; PORTAL FIOCRUZ, 2019a; SBD, 2019a). Destaca-se que a utilização de fitoterápicos e produtos naturais com atividades hipoglicemiantes tem sido amplamente reconhecida como sendo um caminho bastante promissor para amenizar o problema da diabetes (BRAHMACHARI, 2016).

Entretanto, a escassez de estudos com plantas medicinais, que inclui a espécie *A. triangularis*, sugere o desenvolvimento de novas pesquisas que deverão se empenhar em demonstrar o potencial de toxicidade aguda, bem como os potenciais efeitos genotóxicos e mutagênicos do infuso liofilizado (Inf-L) das folhas desta planta. A partir do exposto, a presente pesquisa, justifica-se pela: i) Necessidade de novas terapias antidiabetes mais eficazes, com índices de efeitos adversos reduzidos e acesso à população maximizado; ii) Distribuição geográfica e abundância de *A. triangularis* em território brasileiro e; iii) Necessidade de estudos aprofundados sobre a segurança acerca do consumo desta planta.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeito hipoglicemiante, toxicidade aguda, genotoxicidade e mutagenicidade do infuso liofilizado de folhas de *A. triangularis* (Inf-L-At) em ratos, e mutagenicidade pelo teste Ames e Teste de Mutação e Recombinação Somáticas (SMART), com base no que preconizam as agências reguladoras *Food and Drugs Administration (FDA)*, *Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)* e Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas medicinais e fitoterápicos

A utilização de plantas com fins medicinais para prevenção, tratamento e/ou cura de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade. No início da década de 1990, a OMS divulgou que aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993).

No contexto histórico, a legislação brasileira para medicamentos fitoterápicos, produtos naturais e plantas medicinais, ao longo dos últimos vinte anos, sofreu alterações significativas. Em 1967, foi publicada a primeira regulamentação do uso de fitoterápicos e, somente em 31 de janeiro de 1995, foi elaborada a primeira modificação no registro desses produtos no Brasil, pela Portaria SVS/MS nº 6. Com isso, estabeleceram-se prazos para que as indústrias farmacêuticas testassem e divulgassem dados da eficácia terapêutica e segurança no uso dos medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010; SILVA et al., 2001).

Posteriormente, foram realizadas outras quatro modificações no documento sendo, respectivamente, publicadas em: a) RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 (ANVISA, 2000), que dispôs sobre os registros de medicamentos fitoterápicos e produtos naturais; b) RDC nº 48, de 16 de março de 2004, na qual se aprovou o Regulamento Técnico, atualizando nova normatização para renovação do registro de medicamentos fitoterápicos registrados anteriormente ao ano 1995 e tornando obrigatórios os relatórios de eficácia, segurança e controle de qualidade (ANVISA, 2004); c) RDC nº 14, de 31 de março de 2010, em que se inseriram, como praxes, consultas às metodologias farmacopeicas, nacionais e internacionais, destacando novas exigências para avaliação de aflatoxinas e testes físico-químicos dos produtos vegetais (ANVISA, 2010); e d) RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, em vigor, que dispõe sobre as categorias de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos e estabelece os requisitos mínimos para o registro e renovação (ANVISA, 2014).

A OMS define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (WHO et al., 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Dessa forma, a principal diferença entre planta medicinal e fitoterápico é que este se caracteriza pela elaboração da planta para uma formulação específica (RATES, 2001).

Corroborar-se, então, a portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, publicada pela ANVISA, em que se definem fitoterápicos como sendo "todos medicamentos tecnicamente obtidos e elaborados exclusivamente com matérias-primas vegetais e com finalidade profilática, curativa ou para finalidade diagnóstica, visando benefício para o usuário" (ANVISA, 2020). Outrossim, além de serem utilizadas como medicamentos, as plantas também são consumidas como alimentos em todo o mundo (DE CARVALHO et al., 2010). Sendo assim, as populações que fazem uso de vegetais devem conhecer as principais informações de segurança para evitar danos à saúde provocados pelo consumo inadequado (ANVISA, 2010; CARVALHO et al., 2010; SHIN et al., 2011).

A despeito disso, estudos prévios de Raynor et al. (2011) demonstraram que aproximadamente três quartos de produtos comerciais à base de plantas medicinais não continham informações de segurança para o uso. E apesar do amplo consumo destas plantas como medicamentos, a utilização desses recursos ocorreu sem a devida comprovação científica de suas propriedades farmacológicas e potencial toxicológico (FRANÇA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008; ANVISA, 2020).

Ainda nesse sentido, contextualizado como um sério problema de saúde pública, o potencial tóxico de plantas medicinais e seus efeitos adversos são frequentemente associados a riscos de hipersensibilidade e intoxicações e as interações medicamentosas com outras drogas alopáticas ocasionam possíveis ações sinérgicas ou antagônicas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; DE CARVALHO et al., 2010). Contudo, as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como a fiscalização e o controle comercial pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Neste cenário, estudos farmacológicos em associação às pesquisas etnobotânicas, químicas e agrônômicas tornam possível a ampliação do conhecimento científico de plantas medicinais, com a elucidação de como elas agem, quais são os seus efeitos tóxicos e colaterais, e como seriam suas interações com novos medicamentos alopáticos. Além disso, contribuem com a elaboração de estratégias para o controle de qualidade e produção de fitoterápicos, atendendo às novas normas das agências reguladoras. (ARAÚJO, 2017; TRAESEL et al., 2017; ANVISA, 2020).

2.2. A família Aristolochiaceae

A família Aristolochiaceae é caracterizada por um grupo de plantas floríferas com distribuição predominantemente em regiões tropicais e subtropicais do planeta (WANKE; GONZÁLEZ; NEINHUIS, 2006; BERJANO et al., 2009; LI; NOGUEIRA; LOPES, 2012; WANG, 2014).

Esta família é classificada na ordem Piperales (BERJANO et al., 2009; NOGUEIRA; LOPES, 2012), conforme diversos sistemas de classificação propostos para Aristolochiaceae (Tabela 1) (GONZALES; STEVENSON, 2002; OHI-TOMA et al., 2006; WATANABE; KAJITA; MURATA, 2006). A sistemática de Aristolochiaceae mudou consideravelmente com o avanço da filogenética molecular, bem como diversos outros grupos de angiospermas.

Usualmente, essa família é dividida em duas subfamílias: Asaroideae, a qual inclui os gêneros *Asarum* e *Saruma*; e Aristolochioideae, que abrange os gêneros *Aristolochia* sensu lato (s.l) e *Thottea* (WATANABE, KAJITA, MURATA, 2006). Estudos de revisão descritos por González e Stevenson (2002) propuseram a observação das relações filogenéticas de Aristolochiaceae com base em análise cladística de caracteres morfológicos. Estes posteriormente dividiram *Aristolochia* sensu lato em quatro gêneros, sendo eles *Aristolochia* s. str., *Pararistolochia*, *Endodeca*, e *Isotrema*, distribuídos em duas subtribos (GONZALES; STEVENSON, 2002).

Esta análise corrobora a reconstrução filogenética da família Aristolochiaceae proposta por Ohi-Toma et al. (2006), a qual foi baseada em sequências nucleotídicas em associação a caracteres morfológicos e outros dados moleculares. De acordo com dados de todas as árvores filogenéticas reconstruídas, sugere-se que a *Aristolochia* (s.l) é monofilética e organizada especialmente em duas linhagens, sendo elas: Aristolochiinae e Isotrematinae. Em concordância com González e Stevenson (2002), ambas se subdividem em outras duas sublinhagens, sendo que a Aristolochiinae subdividide-se subsequentemente em *Aristolochia* sensu stricto e *Pararistolochia*, e o clado Isotrematinae se ramifica em *Isotrema* e *Endodeca* (NOGUEIRA; LOPES, 2006; OHI-TOMA et al., 2006).

Entre as Aristolochiaceae brasileiras, diversas possuem uso na medicina popular. No que diz respeito ao potencial terapêutico descrito, destacam-se: i) Efeito anti-inflamatório, anti-reumático, antisséptico (*Aristolochia triangularis*) (CORRÊA; BIASI, 2003); ii) Efeito antiofídico, sudorífico, broncodilatador e abortivo (*Aristolochia birostris*) (FRANÇA et al., 2005); iii) Efeito antimicrobiano (*Aristolochia longa* L.) (DHOUIOUI et al., 2016); iv) Tratamento de transtornos gastrointestinais (*Aristolochia trilobata* L.) (GOIS et al., 2016); e v) Efeito hipotensivo, antimalárico e antidiabetes (*Aristolochia triangularis* e *Aristolochia esperanzae*) (BOLSON et al., 2015; DE ALVARENGA et al., 2017).

Entretanto, para muitas espécies dessa família de plantas, infelizmente, não se possuem conhecimentos científicos básicos acerca de sua biologia, perfil fitoquímico, efeito biológico, eficácia farmacológica ou perfil toxicológico, sendo necessário assim o desenvolvimento de novos estudos para validação do uso seguro, frente ao uso na medicina popular (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; MELO et al., 2017).

Tabela 1. Classificação taxonômica da espécie *Aristolochia triangularis*

Classe	Angiospermae
Subclasse	Magnoliídea
Ordem	Piperales
Superordem	Magnoliiflorae
Família	Aristolochiaceae
Gênero	<i>Aristolochia</i>
Espécie	<i>Aristolochia triangularis</i>

Fonte: o autor (2021).

2.2.1. O gênero *Aristolochia* (s.l) e a espécie *A. triangularis*

Atualmente, da flora brasileira, são conhecidas cerca de 92 espécies do gênero *Aristolochia* (s.l) o qual representa o gênero mais numeroso da família Aristolochiaceae (HOEHNE, 1942; BERJANO et al., 2009; NOGUEIRA; LOPES, 2012). Estas tratam-se de ervas, arbustos, subarbustos e trepadeiras volúveis (Figura 1) (HOEHNE, 1942; BERJANO et al., 2009; NOGUEIRA; LOPES, 2012).

São caracterizadas como plantas floríferas e, em sua morfologia floral, inclui-se o perianto monoclamídeo, zigomorfo, com sépalas petaloides, organizadas e fusionadas em estrutura tubular composta pelo tubo inferior e tubo superior (HOEHNE 1927; VIANA et al., 2016). A porção terminal do tubo superior é conectada aos lábios que margeiam a fauce (abertura do tubo da corola) e, subsequentemente, o androceu e gineceu estão fusionados juntamente ao ginostêmio e ovário ínfero (HOEHNE 1927; VIANA et al., 2016). Assim, essas características atribuídas às espécies do gênero tornam possíveis as adaptações em relação ao mecanismo de polinização por diversos grupos de dípteros (Figura 2) (SAKAI 2002; RULIK et al., 2008; VIANA et al., 2016).

Destas espécies, a maioria habita bordas de matas, apesar de algumas espécies também ocorrerem em regiões descampadas, e são registradas nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (SOUZA; LORENZI, 2005).

A espécie *Aristolochia triangularis* Cham é nomeada popularmente como “cipó mil-hombres”, “mil hombres”, “cipó-mil-hombre” na Argentina e Paraguai, e “Cipó-mil-homens” ou “cipózinho-prá-diabetes” no Brasil, sendo então um etnobotânico verdadeiro por possuir mais de um nome popular. Essa planta é nativa da América do Sul, há registros no Paraguai, na Argentina, e no Brasil ocorre nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, embora seja mais comum

no Rio Grande do Sul (GONZALES; STEVENSON, 2002; BERJANO et al., 2009; CASELLI; SETZ, 2011; BOLSON et al., 2015).

No município de Dourados, MS, a *A. triangularis* é de ocorrência comum, apresenta um histórico importante de utilização na medicina popular para o tratamento de diabetes e outros propósitos medicinais, como o tratamento de reumatismo, infecções, doenças e feridas de pele (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012; HEINRICH et al., 2018; PEREIRA et al., 2018; VIBRANS et al., 2018). Além disso, diversas outras finalidades medicinais são atribuídas para *A. triangularis*: o estudo desenvolvido por Bolson e colaboradores (2015), por exemplo, revelou de forma ampla que as folhas e caules da espécie foram macerados, e a decocção e infusão foram amplamente utilizados na medicina popular, para tratamento obstétrico, doenças do sistema gastrointestinal, trato urinário, doenças cardiovasculares, doenças osteomusculares e de articulações.

Somando-se a isso, utiliza-se preferencialmente, o infuso das folhas de *A. triangularis* para tratamentos como antidiabético, anti-inflamatório, antirreumático, antisséptico, descongestionante e de sistema circulatório. Ademais, também é usada para desintoxicação venosa, gripe, hematomas cutâneos, controle e abstinência de nicotina, enxaqueca, dor de estômago, menopausa, contra impotência, e como antídoto abortivo (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; BAPTISTA et al., 2013; BATTISTI et al., 2013; KUJAWSKA; HILGERT, 2014). Entre os principais estudos etnofarmacológicos descritos na literatura, destaca-se a investigação do potencial terapêutico e a biossegurança farmacológica de *A. triangularis*. Foi, por exemplo, verificado que o extrato diclorometânico de raízes da espécie vegetal possui eficácia anti-inflamatória similar à ação do fármaco comercial fenilbutazona (MUSCHIETTI et al., 1996).

Battisti et al. (2013) corroboram as demais pesquisas, e descrevem que a espécie é tradicionalmente utilizada para fim medicamentoso e seu consumo é em forma de chá após produção do infuso das folhas. Contudo, também descrevem na literatura o uso de metodologias de decocção, maceração e até o uso de etanol para auxiliar na extração domiciliar. Relatos prévios sugerem que os métodos de preparação podem variar muito, embora as seguintes proporções de preparo sejam mais frequentes, e com significância: i) 5g e 50g (medidas estimadas de uma colher de café e xícara de café, respectivamente) de planta/L de água e ii) 0,01 g/mL (1%; m/v) a 0,4 g/mL (40%; m/v), com destaque para a proporção de 10% (m/v).

Schwartzman e colaboradores (1977) descreveram os efeitos citológicos de infusões de ramos de *A. triangularis*. Outros estudos evidenciaram os efeitos da decocção de caules secundários sobre o ciclo celular de meristemas de *Allium cepa* (AMAT et al., 2002) e da

atividade antimicrobacteriana de uma bebida hidroalcoólica preparada do vegetal (OLIVEIRA et al., 2007). Ademais, dados publicados por Pereira et al. (2018) demonstraram que o extrato metanólico de rizomas e de raízes de *A. triangularis*, bem como algumas substâncias isoladas dele, possuíam bioatividades promissoras sobre patógenos microbianos e, em certos casos, comparável ou melhor que àquelas dos fármacos comerciais ampicilina e cloranfenicol. (PEREIRA et al., 2018).

Silva e colaboradores (2019) investigaram o extrato aquoso de *A. triangularis* e observaram ação citotóxica pelos bioensaios de *Artemia salina* e *Allium cepa*. Portanto, os estudos propõem que sejam realizados novos bioensaios para validação do uso seguro, além da exploração do potencial farmacológico desta espécie vegetal.



Figura 1. Visão geral da *Aristolochia triangularis*. Fonte: o autor (2019).



Figura 2. *A. triangularis* – flores em destaque. Fonte: o autor (2019).



Figura 3. *A. triangularis* – folhas em destaque. Fonte: o autor (2019).

2.2.2. Composição química e aspectos metabolômicos

A química de Aristolochiaceae tem sido amplamente estudada e compilada em diversos artigos de revisão. Essa família vegetal produz metabólitos secundários pertencentes a várias classes químicas, ocorrendo mais frequentemente: lignoides, terpenoides, alcaloides, alcalmidas e flavonoides (LEITÃO; KAPLAN, 1992; LOPES; NASCIMENTO; SILVA, 2001; KUMAR et al., 2003; WU et al., 2004; PACHECO et al., 2009; NOGUEIRA, 2010).

Segundo Francisco et al. (2008), os perfis químicos das espécies brasileiras de *Aristolochia* diferem-se significativamente entre si, com certas classes de micromoléculas muitas vezes sendo específicas de uma ou poucas espécies desse gênero. Bicubetas, por exemplo, ocorrem em *Aristolochia lagesiana* e *Aristolochia pubescens*, e bi- e tetraflavonoides em *Aristolochia ridicula*. Já a alantoína, açúcares, ácidos aristolóquicos e lignanas furofurânicas e butirolactônicas, são bastante comuns em *Aristolochia* (PACHECO et al., 2009; NOGUEIRA, 2010).

Os principais achados a respeito da composição química dos caules, rizomas, folhas e raízes de *A. triangularis* evidenciaram um total de 48 compostos - uma lignana furofurânica, uma lignana dibenzilbutânica, dez lignanas dibenzilbutirolactônicas e duas dibenzilbutirolactônicas, três triterpenos, doze diterpenos caurânicos, dois alcaloides aporfínicos, três alcaloides dioxoaporfínicos, um alcaloide tetrahidrobenzilisoquinolínico, oito aristolactamas e cinco ácidos aristolóquicos (RÜCKER et al., 1978, 1981; LOPES et al., 1990; PRIESTAP et al., 1990; LEITÃO et al., 1991; LIN et al., 1997; MICHL et al., 2016; PEREIRA et al., 2018). Entre eles, somente a aristolactama I e os ácidos aristolóquicos I, II, C e D foram, até o momento, identificados em folhas de *A. triangularis* por meio de análises metabolômicas baseadas em CL-EM e RMN. Para melhor visualização, ilustra-se a composição química preliminar do chá das folhas de *A. triangularis*, corroborando o que há na literatura, e além disso, mostrando substâncias até então inéditas nesta espécie, entre elas, lignanas, alcalóides, flavonóides e outros derivados (Figura 4-7).

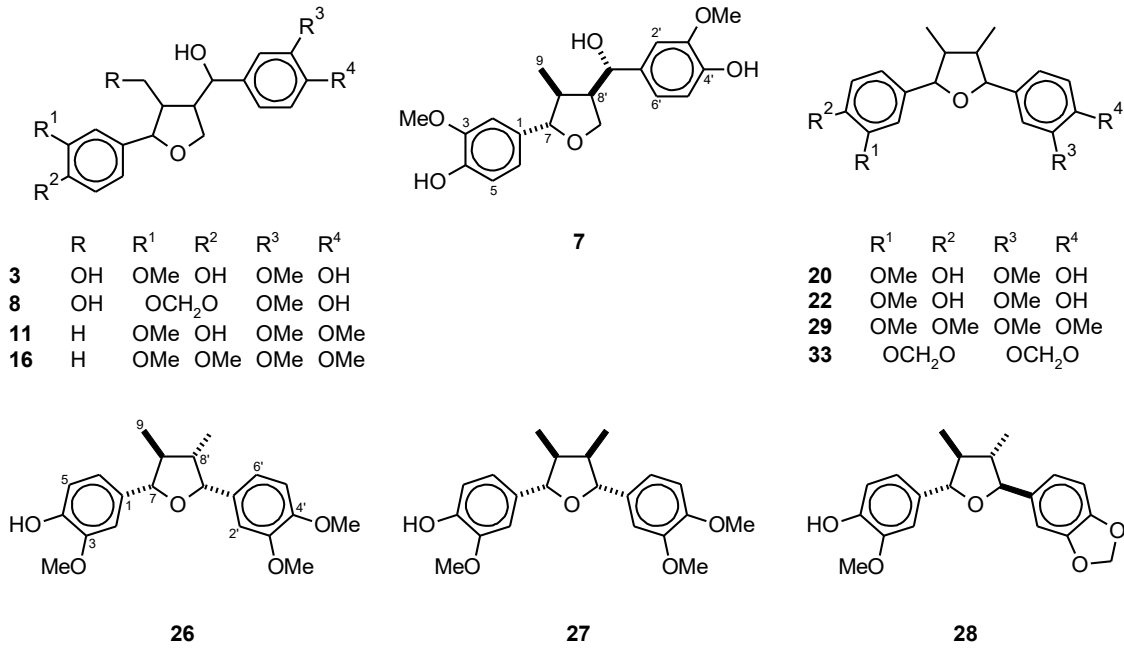


Figura 4: Lignanas identificadas provisoriamente ou definitivamente no infuso das folhas de *A. triangularis*. Fonte: Nogueira (2021).

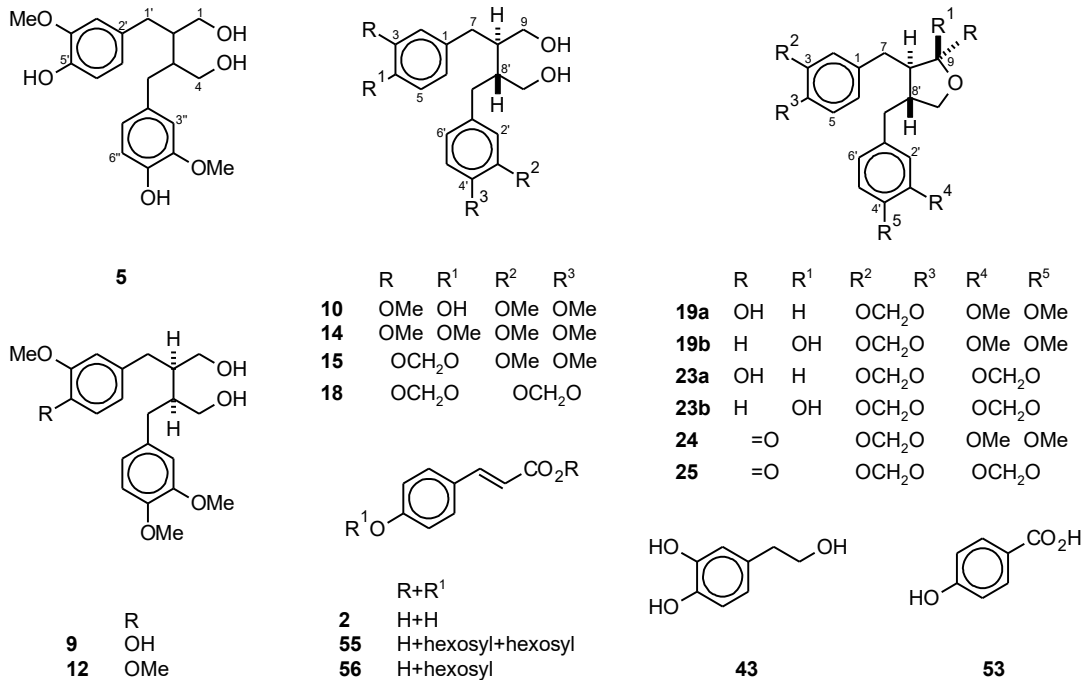


Figura 5: Lignanas e outros compostos identificados provisoriamente ou definitivamente no infuso das folhas de *A. triangularis*. Fonte: Nogueira (2021).

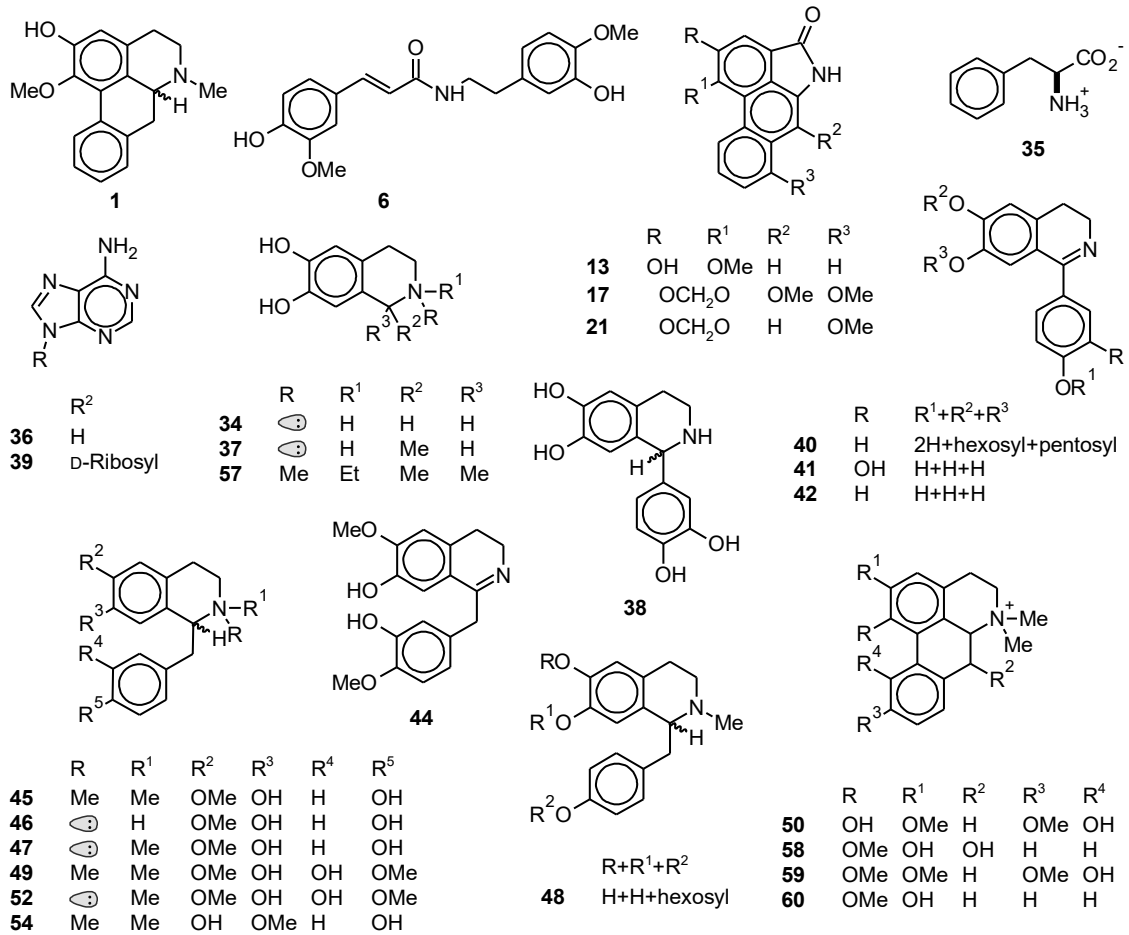


Figura 6: Alcaloides e outros compostos nitrogenados identificados provisoriamente no infuso de *A. triangularis*.
Fonte: Nogueira (2021).

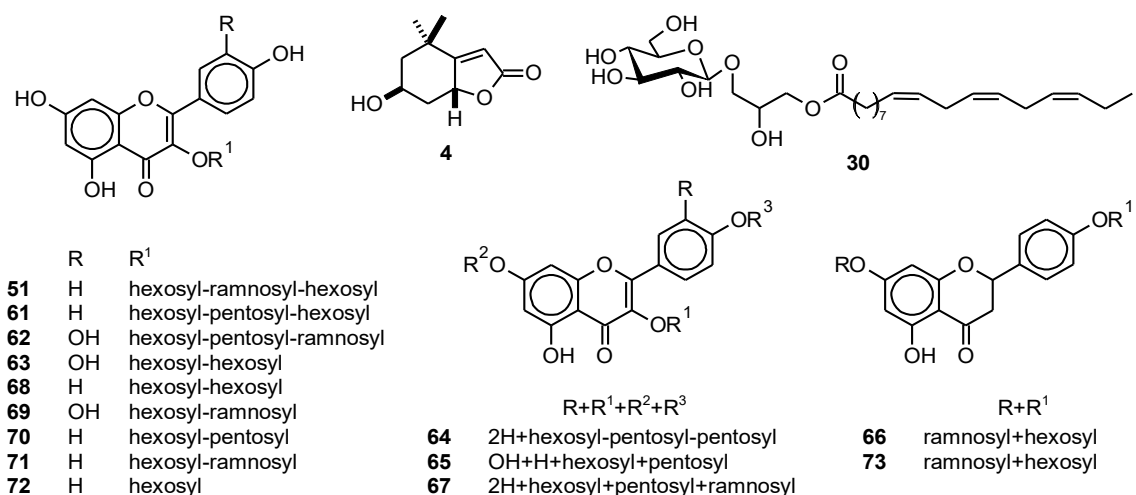


Figura 7: Flavonoides e outras substâncias identificadas (provisoriamente) no infuso das folhas de *A. triangularis*.
Fonte: Nogueira (2021).

Estudos recentes demonstraram que os metabólitos especiais e comuns no gênero *Aristolochia* possuem amplo espectro de atividades biológicas, a saber: i) as lignanas

ariltetralônicas isoladas de *Aristolochia holostylis* apresentaram potencial antiplasmódico, (DA SILVA; LOPES, 2006); ii) a aristolamida II, oriunda de *A. manshurienses*, demonstrou atividade anti-inflamatória (CHUNG et al., 2011); iii) a neolignana licarina A foi potencialmente ativa contra tuberculose (LEÓN-DÍAZ et al., 2013); iv) estudos com extrato metanólico de folhas da espécie *A. cymbifera* revelaram que metabólitos presentes nesse órgão vegetal apresentaram atividade contra promastigotas de *Leishmania chagasi*, além de que, posteriormente, após o fracionamento destes compostos, o diterpeno ácido copálico demonstrou alta toxicidade sobre o parasita *L. chagasi* (TEMPONE et al., 2008); e v) com isolamento de diterpenos caurânicos e lignanas cubeninas de *A. triangularis* (GUETCHUENG, 2017), após investigação acerca dos efeitos biológicos dos metabólitos, observou-se atividade antidiabética, analgésica, anti-inflamatória e antioxidante.

Outrossim, é importante ressaltar que, apesar da presença de metabólitos com atividades biológicas promissoras para o uso terapêutico, nesta espécie também há outras micromoléculas comuns à família Aristolochiaceae, como os ácidos aristolóquicos I e II, que estão associados a efeitos genotóxicos, carcinogênicos e nefrotóxicos, conforme evidências científicas (HOLZBACH, 2018; MICHL et al., 2018).

2.2.2.1. Ácidos aristolóquicos e aristolactamas

Atualmente, os ácidos aristolóquicos (AAs) e as aristolactamas (ALs) são caracterizados como derivados fenântrenicos, os quais apresentam estruturas contendo um grupo ácido carboxílico (-COOH) ligado em C-1 e um grupamento nitro (-NO₂) ou um grupamento lactâmico (CONH) em C-10 respectivamente (Figura 8) (HOLZBACH, 2018).

Estas substâncias são amplamente distribuídas em espécies da família Aristolochiaceae, principalmente nos gêneros *Aristolochia* e *Asarum*, também estão presentes algumas espécies de borboletas (Lepidoptera) da subtribo Troidina, as quais se alimentam de plantas da respectiva família (MICHL et al., 2014; YU et al., 2016; HOLZBACH, 2018).

Entre os metabólitos especiais descritos em espécies de Aristolochias, os mais recorrentes em relatos de pesquisas são os AAs e a aristolactama (derivada dos ácidos). Esse grande número de publicações é justificado pela preocupação em relação ao potencial mutagênico em associação à atividade nefrotóxica, atribuído aos AAs, que causa distúrbios e doenças renais e possuem tendências carcinogênicas (MILICHOVSKÝ et al., 2016; ZINGA et al., 2016; JADOT et al., 2017). Ademais, tais estudos corroboram as análises realizadas por Heinrich e colaboradores (2009), correlacionando o crescente número de evidências de

nefropatia em populações da China e Europa com a bioatividade dos AAs, presentes em quase todos as espécies de *Aristolochia* (LIN et al., 1997; HEINRICH et al., 2009; STIBOROVÁ et al., 2013; SCHMEISER et al., 2014; SORAIA; RAMOS, 2015; MILICHOVSKÝ et al., 2016; ZINGA et al., 2016; JADOT et al., 2017).

Nesse contexto, o mecanismo bioquímico associado à carcinogênese e nefrotoxicidade dos AAs se deve à ligação química que o íon nitrênio de aristolactama faz com a guanina e adenina dos DNAs das células (Figura 8). Estas mutações adquiridas não são reparáveis pelas células e, subsequentemente, promovem nefrotoxicidade e possíveis danos ao DNA (MICHL et al., 2014; JADOT et al., 2017).

2.2.2.2. Compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante

De acordo com a rota biossintética, os metabólitos secundários são classificados em três grupos principais, sendo eles: i) alcaloides, que se caracterizam pela presença de um átomo de nitrogênio ligado a estruturas cíclicas compostas por cinco ou seis átomos de carbono; ii) terpenos e esteroides, constituídos de unidades precursoras isoprenoídicas e formadas pelo arranjo de cinco átomos de carbono; e iii) compostos fenólicos, que representam compostos com um anel aromático substituído por um ou mais grupamentos hidroxila (-OH). Este último, no entanto, é caracterizado por uma grande diversidade estrutural. Além disso, inúmeros outros metabólitos não se enquadram em nenhum desses três grupos (HARBONE; BEXTER; MOSS, 1999; KAPPEL, 2012).

Os compostos fenólicos distribuídos em abundância nos vegetais são os flavonoides, cuja estrutura é caracterizada por um ou mais núcleos aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais (ésteres e glicosídeos) (KAPPEL, 2012). Os flavonoides são biossintetizados a partir de uma unidade fundamental denominada 2-fenilbenzopirona, que é constituída por dois anéis fenólicos ligados à uma ponte de três átomos de carbono (Figura 9) (HARBONE; BEXTER; MOSS, 1999). Estes compostos ocorrem em duas formas distintas - uma delas é em conjugação com açúcares (heterosídeo ou glicosídeo), e a outra na forma livre, sem ligações com açúcares (aglicona ou genina). Nesta última forma, a ligação entre a genina e o açúcar geralmente ocorre por intermédio de uma hidroxila (O-heterosídeos) ou por um átomo de carbono (C-heterosídeos) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; ANDERSEN; MARKHAM, 2006; KAPPEL, 2012).

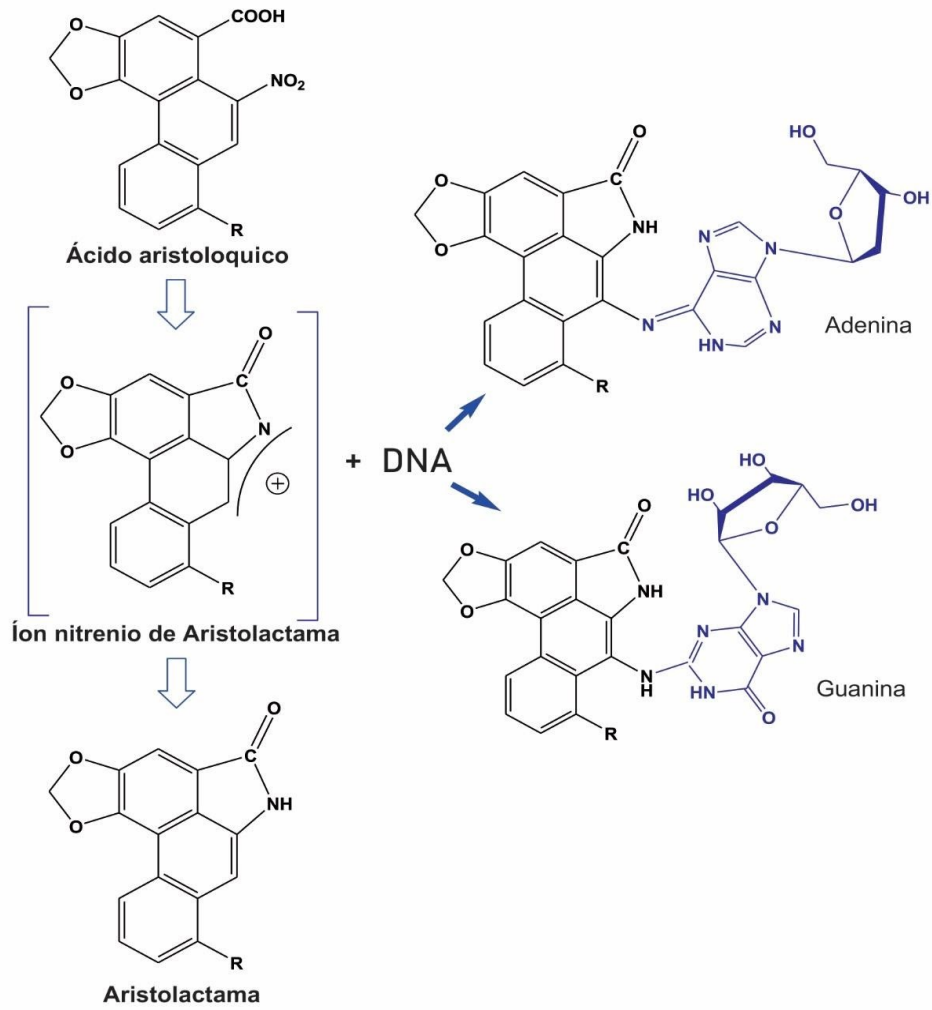


Figura 8. Esquema da interação dos ácidos aristolóquicos com moléculas do DNA. Fonte: O autor (2020).

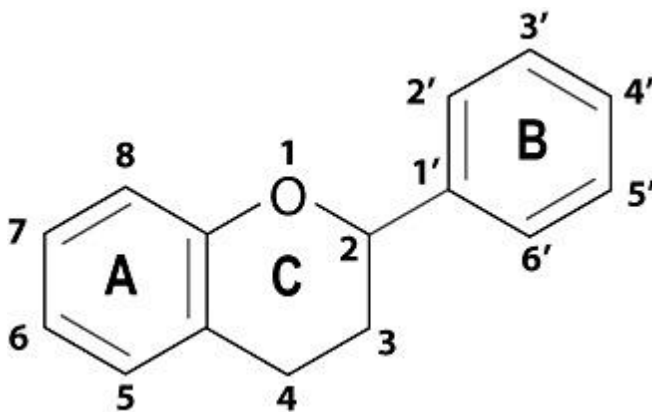


Figura 9. Estrutura básica de um flavonoide. Fonte: Heim; Tagliaferro; Bobilya (2002).

Diversos pesquisadores destacam a atividade antioxidante observada em flavonoides e suas subclasses. Os compostos antioxidantes são representados por agentes capazes de doar radicais livres, elétrons, ou átomos de hidrogênio. Além disto, também apresentam ação

preventiva ou inibitória na formação de espécies reativas, e amenizam o estresse oxidativo (MOUKETTE et al., 2017). Tais substâncias são usualmente divididas em dois grupos: a) Enzimático, que compreende enzimas endógenas como a superóxido redutase (SOD) e catalase (CAT), e b) Não enzimático, constituído pelas vitaminas, licopeno, bilirrubina e flavonoides (DE VASCONCELOS et al., 2014; BOAS et al., 2018).

Muitas outras atividades farmacológicas são atribuídas aos flavonoides, a saber, os processos secretórios da resposta inflamatória; a atividade sobre enzimas, receptores ou carreadores; atividades antimicrobiana, antitrombótica e antialérgica; e ação antioxidante e hipoglicemiante (NOROOZI, 1998; HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002; MOTA et al., 2009; KAPPEL et al., 2013; BOAS, et al., 2018;). Ademais, estudos recentes sobre o potencial biológico de flavonoides mostram que essas micromoléculas possuem atividades regulatórias em células β pancreáticas. Dessa forma, propiciam elevação na produção de insulina, atenuando então a resistência ao hormônio e gerando aumento na captação de glicose (KAPPEL et al., 2013; MOUKETTE et al., 2017; RASOULI et al., 2017). Além disto, outro mecanismo hipoglicemiante já descrito ocorre por meio da inibição de enzimas digestivas atuantes nas quebras de dissacarídeos e oligossacarídeos em monossacarídeos, como as α -amilases e α -glucosidases, o que conseqüentemente retarda a absorção de glicose no organismo (BATI; KWAPE; CHATURVEDI, 2017; RASOULI et al., 2017).

2.3. Homeostasia glicêmica

Em mamíferos, a glicose representa a principal forma de obtenção de energia para o organismo. Ela é uma molécula composta por seis átomos de carbono e por um agrupamento aldeído, além disso é encontrada tanto na forma linear (acíclica) quanto na forma de anel (cíclica), integrando diferentes vias metabólicas nas células (NELSON; COX, 2014).

No organismo humano, os carboidratos são armazenados especialmente na forma de glicogênio, no fígado e em músculos esqueléticos. No entanto, outros tecidos, como o muscular liso, o muscular estriado cardíaco, o tecido adiposo e órgãos como os rins e cérebro também apresentam a capacidade de sintetizar e armazenar o glicogênio (ROACH, 2002; KAPPEL et al., 2013).

A insulina é um hormônio anabólico, intrinsicamente envolvido na glicogênese, na lipogênese e no aumento de síntese proteica, com potencial de inibição dos processos catabólicos como lipólise, proteólise e glicogenólise hepática (ZECCHIN; SAAD, 2002;

BEARDSALL et al., 2003; CARVALHEIRA; MOORE; CHERRINGTON; WASSERMAN, 2003).

A ação deste hormônio é essencial para homeostasia do metabolismo energético e sua secreção ocorre através de células (β) das ilhotas pancreáticas, como reação ao aumento dos níveis de aminoácidos e glicose após as refeições. Neste sentido, sua ação é o principal mecanismo responsável pela regulação do metabolismo energético no organismo (ESCOTT, 2016).

Outro hormônio responsável pela homeostasia do metabolismo da glicose é o glucagon. Caracterizado como hiperglicemiante, é produzido e secretado a partir da clivagem do hormônio pró-glucagon, também produzidos por células α - pancreáticas, cuja principal função é a produção hepática de glicose, além de exercer função antagônica à insulina (MÜLLER et al., 2017).

De maneira geral, o principal mecanismo de estimulação para secreção desse hormônio é a hipoglicemia, embora outras substâncias possuam o mesmo potencial, como o caso do Peptídeo Inibidor Gástrico (GIP) entre outros aminoácidos (GUYTON; HALL, 2017). Logo, os principais processos fisiológicos relacionados a homeostasia da glicose são: 1) gliconeogênese; 2) glicogênese e; 3) glicogenólise, eventos de ocorrência principal no fígado e com acentuado desequilíbrio em caso de DM (SALLES; TERRA; DE ARAÚJO PAULA, 2019).

No período do jejum, ou período pré-prandial, e entre as refeições, há tendência de diminuição nas concentrações de insulina e aumento nas concentrações de glucagon, epinefrina e cortisol. O glucagon, como hormônio hiperglicemiante, inicialmente ativa as vias como gliconeogênese e glicogenólise hepáticas, e causa o aumento das concentrações de glicose no sangue (KAPPEL et al., 2013). No entanto, os estoques de glicogênio hepáticos são limitados e, subsequentemente após um jejum prolongado, a gliconeogênese hepática e renal são exponencialmente aumentadas a partir de outras moléculas, como glicerol, peptídeos e lactato (KAPPEL, 2012; NELSON; COX, 2014).

Nos músculos, a captação de glicose, durante o jejum, é drasticamente reduzida, por isso o metabolismo energético torna-se dependente da lipólise, com impacto no aumento da glicogenólise e proteólise muscular (FERRARI et al., 2019). Outro mecanismo de regulação ocorre com a ativação da lipólise no tecido adiposo, pois consequentemente há um aumento de glicerol e ácidos graxos, os quais atuam como precursores da gliconeogênese e cetose no fígado (BEARDSALL et al., 2003). Para garantia de manutenção da homeostasia glicêmica, a insulina deve ser secretada pelo pâncreas, subsequentemente sua sinalização e iniciação devem ocorrer

para que o hormônio possa ligar-se à receptores insulínicos específicos, e assegurar a captação periférica de glicose e a produção glicêmica endógena nos músculos, fígado e tecido adiposo (KAPPEL, 2012; FERRARI et al., 2019).

A insulina é sinalizada após a ligação ao seu respectivo receptor proteico de superfície celular, também chamado de Receptor Tirosina Quinase (RTK). Logo após acoplar-se à subunidade α do RTK, na região extracelular, a conexão inicializa uma cascata de sinalização no sentido meio intracelular (LEITE; CALLADO; RIBEIRO, 2012). Esta ligação, além de amplificar a sinalização da insulina na subunidade intracelular, age, também, com a integralização dos sinais de outros receptores fundamentais e propicia a auto-fosforilação, com formação de resíduos de tirosina.

As cascatas sinalizadoras de insulina dependente são bastante similares nos tecidos hepático, muscular esquelético, cardíaco e em células endoteliais, no entanto, a resposta biológica é variável e específica em cada tecido, graças às particularidades morfofuncionais de cada estrutura celular (SALLES; TERRA; DE ARAÚJO PAULA, 2019).

No caso do fígado, após a sinalização, a insulina causa o bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise, inibindo a liberação de glicose e aumentando a formação do glicogênio (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Ao mesmo tempo, nos músculos, há um aumento na captação de glicose, via Transportador de Glicose 4 (GLUT4), neste caso há um aumento do glicogênio muscular. Por sua vez, a sinalização de insulina no tecido adiposo, promove o aumento da síntese de ácidos graxos e colesterol (MARINHO et al., 2014; SALLES; TERRA; DE ARAÚJO PAULA, 2019).

A ativação do receptor de superfície celular promove a ativação das vias IR/IRS/PI3K/Akt e IRS/MAPK, as quais representam as principais vias anabólicas de ação da insulina. A via IR/IRS/PI3K/Akt proporciona a captação de glicose, desencadeando o aumento na síntese de glicogênio, de proteínas e lipídeos. Já a via IRS/MAPK promove a proliferação e diferenciação celular. Tecidos como o hepático, o muscular e o adiposo, respectivamente apresentam as maiores concentrações do receptor de insulina (SALLES; TERRA; DE ARAÚJO PAULA, 2019).

A glicose entra no meio intracelular acopladas aos Transportadores de Glicose (GLUTs) e é fosforilada à glicose 6-fosfato (glicose-6P), pela hexoquinase muscular ou pela glicoquinase/ hexoquinase hepáticas, e acaba processada em três vias distintas, sendo elas: 1) via glicolítica; 2) via das pentoses fosfato; e, 3) via de síntese de glicogênio (MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015). Após interação com a enzima fosfoglicomutase, a glicose-6P sofre a conversão à glicose 1-fosfato (glicose-1P), subsequentemente a ação da enzima uridina-

difosfato, e converte a glicose-1P em Uridina-Difosfato Glicose Pirofosforilase (UDP-G) (KAPPEL et al., 2013).

Desta maneira, a UDP-G exerce papel fundamental na formação do glicogênio, através da doação de unidades glicosil, sendo a reação catalisada pela ação enzimática do Glicogênio Sintase (GS), outra enzima essencial na síntese de glicogênio (ROACH, 2002; FERRER et al., 2003; MARINHO et al., 2014, 2015). Além da GS, a glicogenina, (proteína iniciadora) e uma enzima ramificadora participam do processo de síntese, armazenamento de glicogênio hepático e muscular e homeostasia glicêmica (; ROACH, 2002; FERRER et al., 2003; KAPPEL et al., 2013).

2.4. Diabetes melito

2.4.1 Aspectos gerais

O envelhecimento populacional em associação a expansão urbana, estilos de vida pouco saudáveis, além da obesidade, caracterizam as principais causas responsáveis pela prevalência e aumento na incidência de diabetes no Brasil. A respeito do estilo de vida, exemplifica-se dietas inadequadas e hábitos sedentários, como a diminuição da prática de atividades físicas, relacionada ao crescente uso de tecnologias (BRASIL, 2006, 2013; SBD, 2019).

Segundo a OMS, nos últimos anos houve uma progressão alarmante de novos casos de diabetes e calcula-se mais de 463 milhões de pessoas com diagnóstico de Diabetes Melito (DM) no mundo. Assim, a doença caracteriza-se como uma epidemia mundial, silenciosa e torna-se um grande desafio para os sistemas de saúde das nações no século XXI (BRASIL, 2006; WHO, 2016; SBD, 2016, 2019a). No Brasil, esse cenário não é diferente, pois em 2018 foram estimadas cerca de treze milhões de pessoas diagnosticadas com DM e tais números deverão chegar a aproximadamente 21 milhões no ano de 2045 (WHO, 2016; IDF, 2017; SBD, 2019b).

Curiosamente, o Brasil ocupa o quarto lugar entre os países com maior número de pessoas que desconhecem o seu diagnóstico para o DM, por outro lado é o primeiro posicionado no rank de pessoas diabéticas vivendo na América do Sul. Dados publicados pela Federação Internacional de Diabetes, (IDF, 2017) corroboram as estatísticas e apontam aproximadamente 48.000 mortes de adultos com idade entre 20-60 anos como resultado da diabetes no país (IDF, 2017; SBD, 2019a, 2019b). A DM é uma doença crônica sistêmica de progressão lenta, com natureza complexa, multifatorial e consiste em uma síndrome metabólica caracterizada

especialmente pela hiperglicemia (DA CONCEIÇÃO; DA SILVA; BARBOSA, 2017; SBD, 2019a, 2019b).

De acordo com o Departamento de Atenção Básica (DAB) do Ministério da Saúde (MS), a hiperglicemia crônica é decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina e também é considerada como fator primário desencadeador de complicações relacionadas a doença (Figura 10). Além disso, está associada a disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (JAMES et al., 2003; KAPPEL, 2012; BRASIL, 2006, 2013; SBD, 2019a, 2019b).

Anteriormente os tipos de diabetes eram classificados de acordo com a combinação das manifestações clínicas com o modo de tratamento e eram estabelecidos dois tipos, sendo eles: 1) Diabetes melito tipo I ou Diabetes Insulino-Dependente (DMID) e 2) Diabetes melito tipo II ou Diabetes não Insulino-Dependente, (DMNID) (ADA, 1997).

No entanto, esse método classificatório era pouco eficiente e dificilmente estabeleciam-se diferenças etiopatológicas assertivas entre pacientes com DMID e DMNID, e conseqüentemente ambos os tipos acabavam aderindo à insulinoterapia, pós-diagnóstico para prevenção à cetose. Este fato, tornava confusa a classificação anterior. Neste contexto, a classificação da DM atualmente aceita pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e pela OMS foi proposta em 1997 pela Associação Americana de Diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA) (ADA, 2011).

Em suma, a redefinição foi baseada na etiologia da doença e não apenas no seu modo de tratamento, portanto, foi atribuída maior ênfase na associação entre genética, histórico familiar e características fenotípicas dos pacientes. Assim, em 2018 foram estabelecidos novos critérios de diagnóstico para diabetes, organizados e publicados pela ADA (Tabela 2) (ADA, 1997, 2018, 2019).

2.4.2. Tipos de diabetes melito

A Diabetes Melito Tipo 1 (DM1) é resultante da destruição de células (β)-pancreáticas, o que caracteriza a deficiência absoluta de insulina e subsequentemente hiperglicemia (ADA, 2007; GENUTH, 2008). É possível também associar a hiperglicemia fenotípica da DM1 não somente à desregulação na produção e ação da insulina, mas também à ausência de supressão da secreção do glucagon (SHAH et al., 1999).

Na fisiopatologia desse tipo de diabetes estão envolvidos diversos fatores genéticos e ambientais, além de um conjunto de genes que se situam no sistema Antígeno Leucocitário

Humano (HLA), portanto a DM1 representa um processo imunomediado e atinge aproximadamente 5 a 10% dos casos (ADA, 2007). Quando não há evidências de atividade autoimune por mediação de células como linfócitos T ou macrófagos, ou quando há causas incomuns para a destruição das células (β) pancreáticas classifica-se a doença como DM tipo 1/ idiopática e esta representa a minoria dos casos (LALLI, TSUKUMO, 2012; SBD, 2015, 2016).

Por outro lado, a Diabetes Melito Tipo 2 (DM2) abrange em média 90% a 95% dos casos diagnosticados e caracteriza-se pela resistência em vários níveis à ação da insulina com deficiência no mecanismo de sua secreção e desregulação na produção hepática de glicose. Atualmente, a DM2 é considerada importante causa de morbidade e mortalidade (DA CONCEIÇÃO; DA SILVA; BARBOSA, 2017; SBD, 2019b).

Esse tipo de diabetes pode ocorrer em qualquer idade, embora os riscos sejam mais elevados a partir dos 40 anos. Entre os principais fatores de risco estão o sobrepeso e/ou obesidade em associação à hipertensão arterial, dislipidemia e sedentarismo (ADA, 2007; SBD, 2009, 2015, 2016). Outro fator decisivo para determinar o risco é a análise do histórico familiar para diabetes de indivíduos saudáveis ou mulheres que tenham desenvolvido Diabetes Gestacional (DG). Considera-se que estes grupos de pessoas estão mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença (MONAHAN et al, 2010).

Tabela 2. Critérios diagnósticos para o diabetes

Crítérios	Comentários
A1C \geq 6,5% =ou=	O teste deve ser realizado por meio de método rastreável ao método do DCCT e devidamente certificado pelo <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> (NGSP)
glicemia de jejum \geq126 mg/dL =ou=	O período de jejum deve ser definido como ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas. Na ausência de hiperglicemia comprovada, os resultados devem ser confirmados com a repetição dos testes.
glicemia 2 h após sobrecarga com 75 g de glicose: \geq 200mg/dL =ou=	Em teste oral de tolerância à glicose. Esse teste deverá ser conduzido com a ingestão de uma sobrecarga de 75 g de glicose anidra dissolvida em água em todos os indivíduos com glicemia de jejum entre 100 mg/dL e 125 mg/dL.
glicemia ao acaso \geq 200 mg/dL	Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia, ou em crise hiperglicêmica.
Importante: a positividade de qualquer um dos parâmetros diagnósticos descritos confirma o diagnóstico de diabetes. Na ausência de hiperglicemia comprovada, os resultados devem ser confirmados com a repetição dos testes, exceto no TOTG e na hiperglicemia comprovada.	

Fonte: Adaptado: (2019;2018).

A DG é caracterizada pela intolerância à glicose, nos mais variados níveis, e aproximadamente 7% das gestações são acometidas por complicações associadas a hiperglicemia. Normalmente é diagnosticada na segunda metade do período gestacional, embora em alguns casos também haja detecção logo no início da gestação (ADA, 2007, 2011; SBD, 2015, 2016).

Após o período gestacional, pode, ou não, persistir, sendo o fator determinante a reversibilidade definitiva da intolerância a glicose para tolerância normal pós-gestacional. Portanto, deve-se reavaliar a paciente algumas semanas pós-parto e reclassificar a DG em glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose baixa, normoglicemia ou hiperglicemia (DM2) (ADA, 2011). No entanto, mesmo que subsequentemente após a reavaliação não ocorra diagnóstico para diabetes melito, o risco para o desenvolvimento de DM2 ainda é elevado, estimativa-se em 10%-65% a possibilidade de ocorrer diabetes em até 16 anos após o parto. (IDF, 2015; SBD, 2015, 2016).

Conforme a atual classificação de diabetes e critérios de diagnósticos para pré-diabetes e risco aumentado, ainda há outras duas categorias, caracterizadas como glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose. Juntas são consideradas como fatores de risco para desenvolvimento e progressão de DM e doenças cardiovasculares (Tabela 3) (SBD, 2015, 2016; ADA, 2017, 2019).

Na categoria “outros tipos de DM”, destaca-se o *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY), um subtipo caracterizado pela desregulação na secreção de insulina,

embora não seja necessária a insulino-terapia pois não há disposição para progressão à cetose. DM tipo MODY representa cerca de 2% dos casos diagnosticados para a diabetes melito, além disso é prevalente em jovens com menos de 25 anos não obesos (CAMPAGNOLO et al., 2005). A transmissão é autossômica dominante e persiste em pelo menos três gerações consecutivas, além da condição monogênica, também apresenta ampla heterogeneidade, sendo descritos atualmente seis genes distintos causadores da doença (MESSAAOUI; TENOUTASSE; DORCHY, 2016).

Nesta categoria, ainda há outro tipo de DM, a Diabetes insipidus (DI), descrita como síndrome poliúrica. Este tipo de diabetes apresenta-se em dois subtipos de DI: 1) O DI central, resultante da deficiência total ou parcial na síntese de Vasopressina (VP) e 2) A DI nefrogênica, concomitante da resistência renal à VP. Geralmente esse tipo de diabetes é adquirido, embora sua etiologia também possa estar relacionada a problemas congênitos e mutações, e quando ocorrer na primeira infância, as causas genéticas são as mais prováveis e deverão ser avaliadas (CHRIST-CRAIN et al., 2019).

Tabela 3. Critérios diagnósticos para o pré-diabetes e para risco aumentado de diabetes

Critérios	Comentários
Glicemia de jejum entre 100 mg/dL e 125 mg/dL =ou=	Condições anteriormente denominada “glicemia de jejum alterada”.
Glicemia 2 h após sobrecarga com 75 g de glicose: entre 140 mg/dL e 199 mg/dL =ou=	Em teste oral de tolerância à glicose. Condições anteriormente denominada “tolerância diminuída à glicose”.
A1C entre 5,7% e 6,4%	Conforme recomendações recentes para uso da A1C no diagnóstico do diabetes e do pré-diabetes
Importante: a positividade de qualquer um dos parâmetros diagnósticos descritos confirma o diagnóstico	

Fonte: Adaptado: ADA (2019;2018).

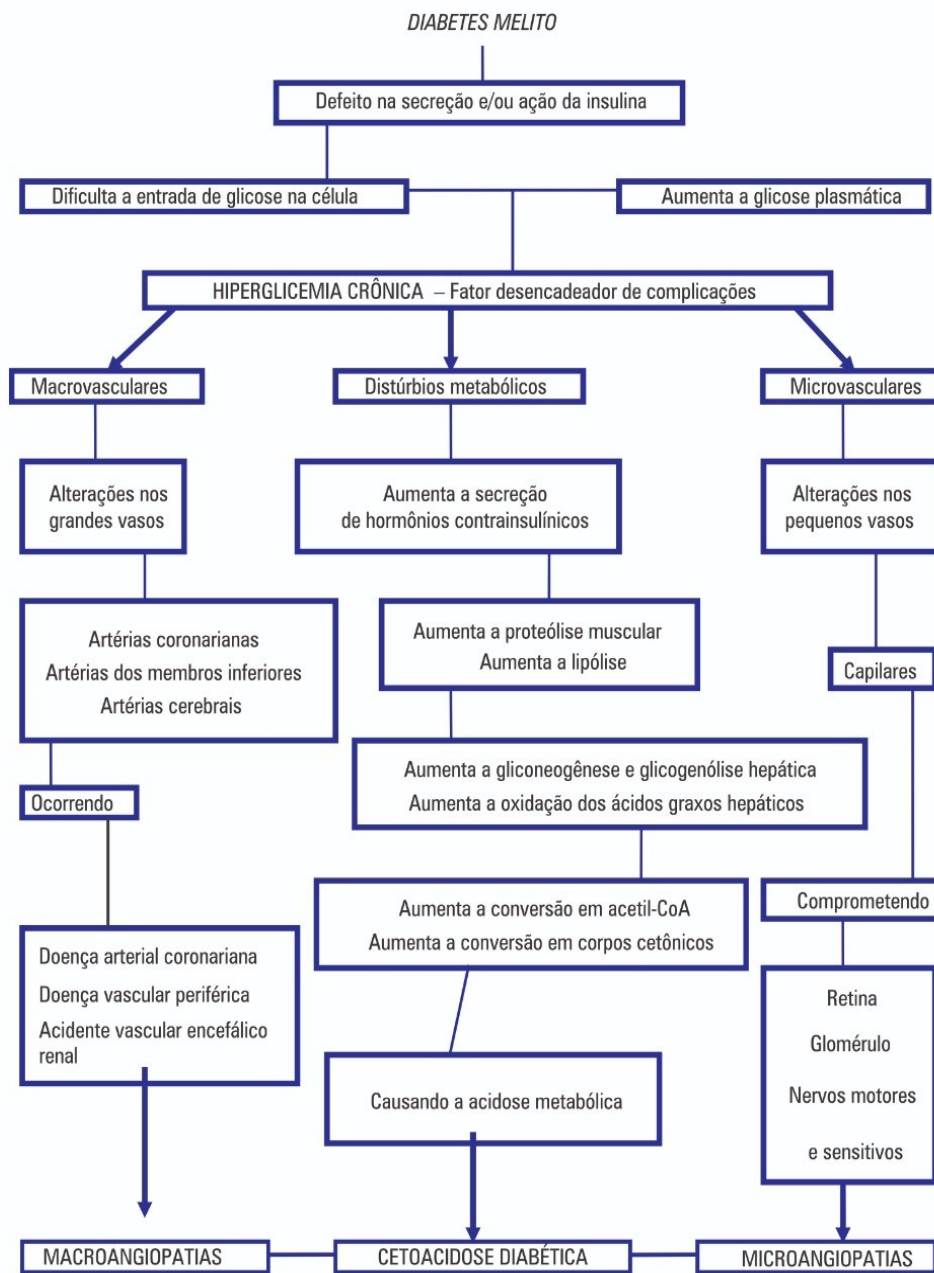


Figura 10. Hiperglicemia crônica e suas complicações. Fonte: Adaptado: ADA (2019;2018).

2.4.3. Estudo de hiperglicemia e diabetes em modelos experimentais em ratos *Wistar*

Estudos experimentais em animais com diabetes induzida são amplamente empregados em pesquisas de avaliação do potencial farmacológico de produtos naturais e plantas medicinais. Em sua maioria, estes estudos subsidiam a elaboração de novas terapias com potencial elucidação dos mecanismos fisiopatológicos e alterações endócrinas-metabólicas tipicamente envolvidas na DM em humanos (ROSELINO et al., 2012).

Estudos *in vivo* de hiperglicemia e diabetes são extremamente necessários para as áreas da farmacologia e saúde pública e propiciam a compreensão da fisiopatologia do diabetes, de suas complicações, da prevenção de lesões aguda ou crônica nos diferentes órgãos envolvidos, além da busca de um possível tratamento efetivo ou cura da doença (KAPPEL, 2012).

Recomenda-se, ainda, que em estudos com objetivo de avaliação do potencial farmacológico de um novo produto, onde ocorra aplicação de substâncias diabetogênicas em ratos *Wistar*, tais modelos experimentais devem ser realizados em associação a testes de toxicidade para validação do uso seguro da substância objeto de estudo (DE LIMA et al., 2016; SBD, 2015, 2016; TRAESEL et al 2017).

Entre as diversas substâncias utilizadas para a indução de diabetes em animais, destacam-se a aloxana e a estreptozotocina. Neste contexto, um dos principais modelos de indução de diabetes é realizado com aplicações de aloxana, um derivado da pirimidina, cuja ação é específica, citotóxica e seletiva para destruição de células β -pancreáticas, e estimula a insuficiência insulínica do pâncreas (LEME et al., 2010).

Este evento provoca alterações fisiológicas e clínicas comuns em diabetes induzidas em animais, com grande aumento nos níveis de glucagon e insulinemia. Posteriormente, há ativação dos Transportadores de Glicose-2 (GLUT2) e, em consequência à formação de radicais livres, ocorrem reações que ocasionam diversos tipos de lesões celulares (LENZEN, 2008). Entre os principais fármacos comerciais, a glibenclamida, anti-hiperglicêmico oral, é uma sulfoniluréia de segunda geração usada no tratamento da diabetes (KAPPEL, 2012).

Como as demais sulfoniluréias, este anti-hiperglicêmico, atua no bloqueio dos canais de canais K_{ATP} , com despolarização da membrana de células β , além disso, entre os mecanismos de ação, ao se ligarem nas subunidades SUR, desencadeia efeito estimulatório com secreção de insulina e efeito hipoglicemiante (STANDEN, 1997). Nestas condições, torna-se viável a realização de estudos experimentais em animais hiperglicêmicos com testes de produtos com potencias antidiabéticos. Esses estudos devem considerar ratos diabéticos aqueles que

apresentem glicemia em jejum acima de 300 mg/dL, enquanto a glicemia em jejum em ratos normoglicêmicos é variável entre 100 e 130 mg/dL (SBD, 2009; KAPPEL et al., 2012).

Tradicionalmente, outro ensaio recomendado é o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), bastante difundido na prática clínica para diagnóstico de DM2 e intolerância à glicose. Além disso, ele ocorre em associação aos testes baseados em medida de glicose, glicemia em jejum e hemoglobina glicada/HbA1c em humanos (KAPPEL et al., 2013; SILVA et al., 2020). Este ensaio é amplamente utilizado para avaliação do potencial anti-hiperglicêmico de novas substâncias testes, em modelos animais com diabetes induzida (BOSI et al., 2009; KAPPEL et al, 2012, 2013). Considera-se um teste de fácil reprodução com base na avaliação glicêmica ao longo de um período, após a administração de uma sobrecarga de glicose no organismo (BENNETT; GUO; DHARMAGE, 2007; BOSI, et al., 2009).

Neste modelo, além da glicemia, também é possível determinar a insulinemia e estimar a sensibilidade à secreção ou ação insulínica, por meio do cálculo de índices e avaliação da ação de dissacarídates e síntese de glicogênio hepático e muscular (FOLADOR et al., 2010; KAPPEL et al., 2013).

2.4.3.1. Delineamento experimental do bioensaio de atividade anti-hiperglicêmica

2.4.3.1.1. Animais

Neste bioensaio são utilizados 25 ratos Wistar machos, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, com idade média de 50-55 dias de idade e peso médio de 180-200 gramas. Os animais são mantidos em gaiolas de polipropileno, sob condições controladas: alimentação baseada em ração comercial, água *ad libitum*, sala climatizada e ciclo claro-escuro (luzes apagadas das 18h00min às 6h00min).

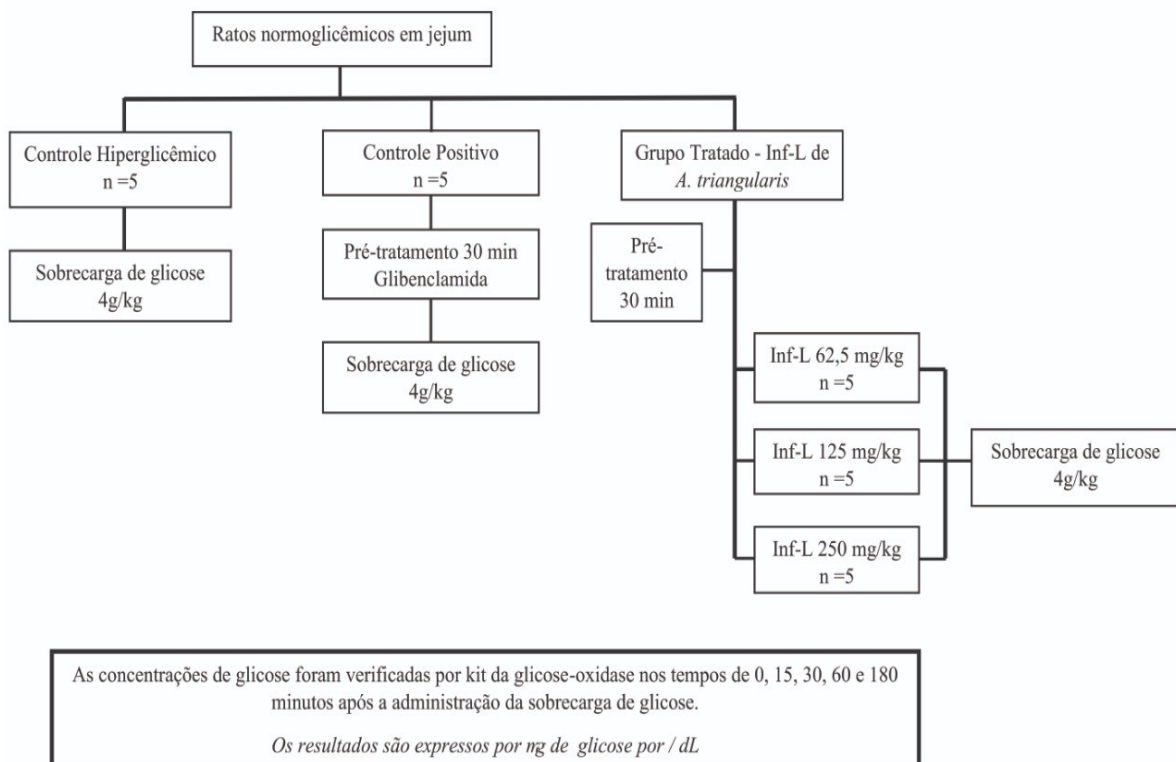
Posteriormente são monitorados seguindo-se as diretrizes do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e conforme modelos experimentais padronizados em diversas pesquisas acerca do potencial antidiabético de produtos naturais (KAPPEL, 2012; KAPPEL et al.,2012, 2013).

2.4.3.1.2. Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

O desenho experimental deste teste é baseado em pesquisas de Kappel e colaboradores (2012), e são selecionados ratos normoglicêmicos, mantidos em jejum por 12 horas. Estes animais são randomizados em cinco grupos distintos conforme descrito no fluxograma 1.

1) Grupo controle hiperglicêmico: (sem qualquer tratamento, mas que recebem glicose (4g/kg); 2) Grupo controle positivo: Os animais são tratados com o fármaco referência antidiabetes, glibenclamida (10 mg/kg) e subsequentemente recebem sobrecarga de glicose (4g/kg); 3) Grupos 3, 4 e 5: Os animais nestes grupos, recebem o Inf-L de *A. triangularis*, nas respectivas dosagens 62,5, 125 e 250 mg/kg, respectivamente, para obtenção da curva dose-resposta e, após 30 minutos, é administrada uma sobrecarga de glicose em cada animal (4g/kg). Todos os tratamentos são realizados via oral (gavagem). Os níveis de glicose no plasma são verificados nos tempos: 15, 30, 60 e 180 minutos após o início do teste; e os valores foram obtidos com utilização do kit glicose-oxidase, da marca comercial *Accu-Chek*.

Fluxograma 1: Tratamento de ratos normais hiperglicêmicos – Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

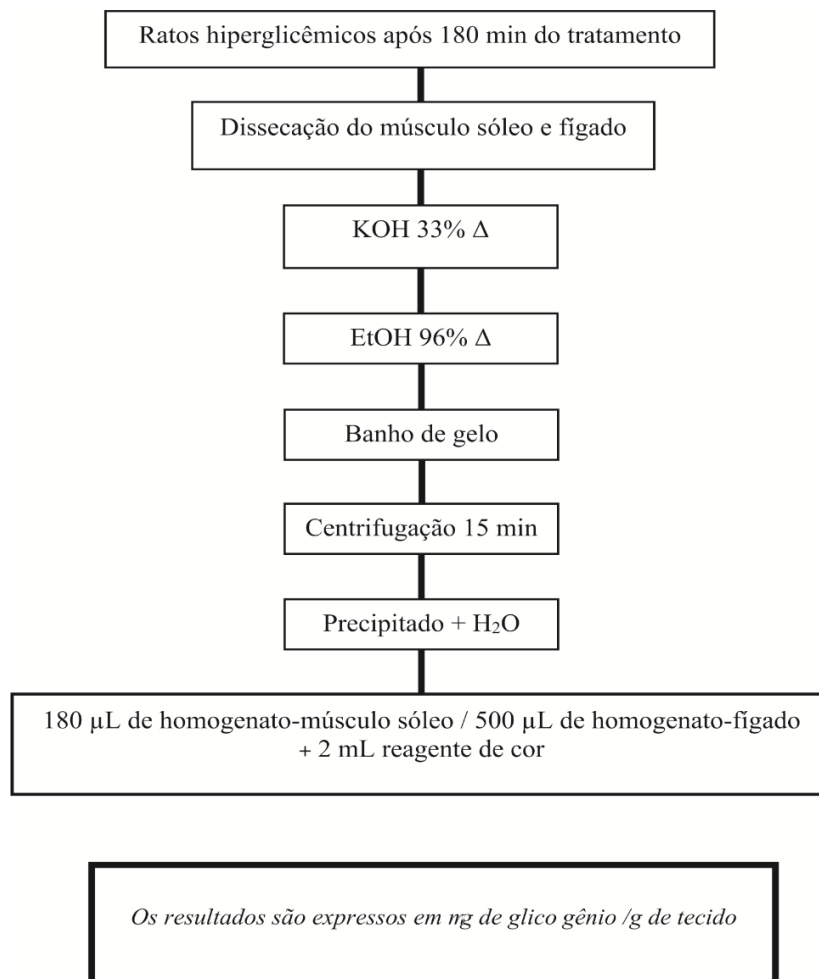


Fonte: o autor (2020).

2.4.3.1.3. *Medida do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, e atividade das dissacaridasas intestinais em ratos normoglicêmicos após o tratamento com diferentes doses do Inf-L A. triangularis.*

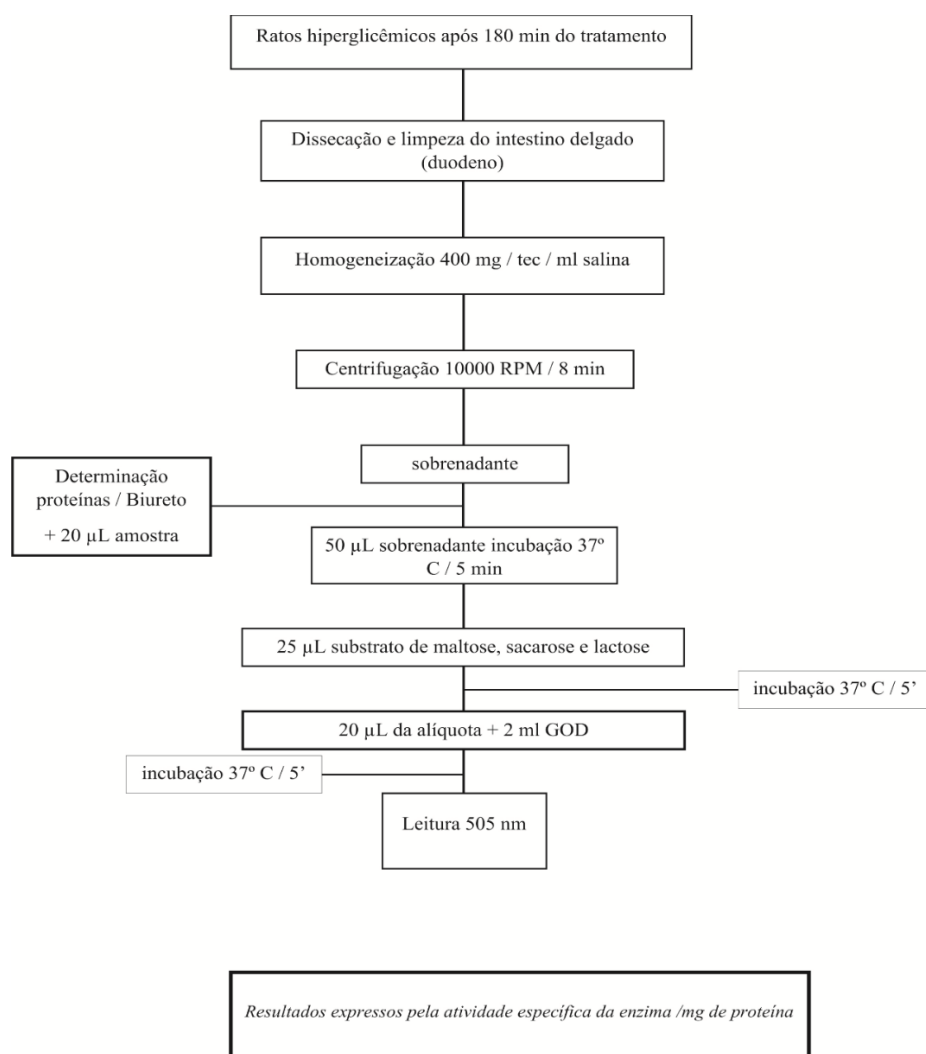
Após a administração por via oral das respectivas dosagens do Inf-L de *A. triangularis* (Inf-L-At), são coletados o fígado e os músculos sóleos de cada animal, logo após, os respectivos órgãos são pesados e posteriormente utiliza-se o protocolo específico para precipitação do glicogênio hepático descrito por Krisman (1962) com pequenas modificações e inclusão do método para precipitação do glicogênio muscular proposto por Zannata e colaboradores (2008). Seguidamente para determinação das concentrações de glicogênio hepático e muscular oriundos dos diferentes tratamentos utiliza-se a curva de calibração baseada na substância padrão do glicogênio (Fluxograma 2) (PEDROSO, 2019).

Fluxograma 2: Determinação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático.



Para avaliação da atividade de enzimas intestinais envolvidas na homeostasia da glicose, utilizou-se o protocolo descrito por Kappel e colaboradores (2012), com separação, pesagem, dissecação e processamento da porção total do intestino delgado (Fluxograma 3). Estes métodos possibilitam a avaliação do perfil hipoglicemiante do Inf-L-At, quando comparados aos efeitos observados no grupo controle positivo, visto que hipoglicemiantes orais e comerciais, como glibenclâmid, promovem um aumento da sensibilidade à insulina e, com isso, há redução da produção hepática de glicose por diminuição da glicogenólise, com aumento na captação de glicose no fígado e nos músculos sóleos, e diminuição na absorção de carboidratos intestinais através de sinalização semelhante à via sinalizadora de insulina, contribuindo também com estímulos para a síntese e translocação proteica do GLUT4 (GHOSH, R. et al., 2004; ZANNATA et al., 2008).

Fluxograma 3: Determinação da atividade das dissacaridases intestinais.



Fonte: o autor (2020).

2.5. Toxicologia: ensaios pré-clínicos de plantas medicinais, produtos naturais e fitoterápicos

Em síntese, a biodiversidade vegetal dispõe de inúmeras espécies com amplas propriedades funcionais e medicinais e os registros etnofarmacológicos sugerem que as comunidades locais façam uso constante de plantas medicinais para prevenção, tratamento ou cura de diversas enfermidades, baseados somente no conhecimento empírico, por acreditarem que estas são isentas de riscos à saúde (DE LIMA et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017; TRAESEL et al., 2017; TOLOUEI et al., 2018).

As plantas possuem biodisponíveis uma diversidade de metabólitos secundários que estão relacionados aos mecanismos de proteção do vegetal contra predadores e patógenos. Destes, muitos metabólitos são considerados tóxicos por produzirem reações intoxicantes quando entram em contato com o organismo humano, ou animal, e constituem fatores de risco para a homeostase fisiológica e, além disso, podem evoluir para o óbito (VASCONCELOS et al., 2009; JESUS; SUCHARA, 2013; CAMPOS et al., 2016).

A avaliação dos aspectos toxicológicos das espécies vegetais de uso popular é imprescindível, tendo em vista a ampla distribuição destas nos biomas brasileiros e a tradição do uso popular. Ademais, estudos para garantir a eficácia farmacológica e ausência de toxicidade tornaram-se ferramentas essenciais para definição de estratégias de utilização segura (MENDONÇA et al., 2020).

Conforme dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), o Brasil obteve registros de 761 e 592 novos casos de intoxicação humana, nos anos de 2014 e 2016 respectivamente (SINITOX, 2021). No entanto, estima-se que esses registros podem ser superiores, já que no país não há obrigatoriedade na emissão das notificações de eventos toxicológicos, o que pode favorecer o aumento das subnotificações.

Por outro lado, algumas das notificações emitidas normalmente determinam como principais causas de intoxicações o uso terapêutico, a automedicação, a ingestão alimentar e/ou a tentativa de suicídio, homicídio e/ou aborto, sendo que, na maioria dos relatos, não houve prescrição médica para o consumo (CAMPOS et al., 2016; SINITOX, 2021).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi aprovada em 2006 e norteada pelos princípios de melhorias na atenção básica à saúde do Sistema Único de Saúde (SUS). Ela vislumbrou o desenvolvimento econômico sustentável e garantia de acesso seguro e racional no consumo de plantas medicinais, produtos naturais e fitoterápicos.

Conseqüentemente, diversos estudos para avaliação das reações adversas e segurança terapêutica foram normatizados e recomendados (DA SILVA et al., 2020).

A regulamentação de estudos farmacológicos e toxicológicos, em especial, de novos fármacos são regulamentados por três principais agências: FDA, *European Medicines Agency* (EMA) e *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PMDA). Entretanto, diferem-se entre si e para harmonização destas diferenças, em 2008, foi estabelecido o Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH) (ICH, 2008).

A ANVISA, membro regular do ICH desde o ano de 2016, elaborou o atual Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, publicado em 2013, baseando-se em recomendações internacionais das agências de vigilância de medicamentos: *Environmental Protection Agency* (EPA), FDA e OECD (ANVISA, 2013).

Os protocolos de estudos pré-clínicos são descritos neste guia e direcionam para a avaliação e identificação dos efeitos adversos associados ao perfil toxicológico das substâncias sob os sistemas fisiológicos ou órgão-alvo. Além disso, caracteriza a relação dose-resposta, efeitos agudo, subagudo e crônico, e a reversibilidade dos efeitos tóxicos no organismo (OECD, 2008a, 2008b).

Assim, os estudos pré-clínicos são indicados para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais, produtos naturais ou fitoterápicos, e auxiliam na elucidação dos diferentes aspectos de intoxicações e na identificação de substâncias promissoras para síntese e prospecção de novos fármacos (HARVEY et al., 1998; ARAUJO et al., 2017). Ademais, também contribuem para a implementação de diretrizes de estratégias das políticas de plantas medicinais no SUS, uso racional e suas interações medicamentos/plantas (DA SILVA TEIXEIRA et al., 2020).

Diante do exposto, entre os principais protocolos de ensaios pré-clínicos recomendados pelas agências regulatórias, os ensaios de toxicidade por dose única (aguda), genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e carcinogenicidade são essenciais para garantia da segurança terapêutica e toxicológica de espécies vegetais e novos fármacos, e, em paralelo, para a avaliação dos potenciais farmacológicos descritos na medicina tradicional.

2.5.1. Toxicidade aguda

Estudos de toxicidade aguda são desenvolvidos com o objetivo de investigar o potencial de novas substâncias causarem danos à saúde humana, após exposição direta ou indireta. Estes testes são considerados padrões de avaliação toxicológica e são desenvolvidos preferencialmente com uso de roedores (VALADARES, 2006; OECD, 2008a, 2008b).

Os testes classificam as amostras analisadas conforme os aspectos toxicológicos descritos como resultados e de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Globally Harmonised System* (GHS) (Tabela 4) (ANVISA, 2013, 2016). Além de contribuir para identificação do potencial tóxico em órgãos-alvo, estima a letalidade e também viabiliza a determinação dos padrões toxicocinéticos e a relação dose-resposta da respectiva substância administrada em uma ou mais doses no período inferior a 24 horas. Subsequentemente, os animais são mantidos em observação por 14 dias consecutivos após o tratamento (PURCHASE, et al., 1998; VALADARES, 2006; ANVISA, 2013; TRAESEL, 2014).

De acordo com Valadares (2006):

Em 1992, o Teste de Dose Fixa (FDP) foi adotado pela OECD (OECD 420) como alternativa para os pesquisadores evitarem o uso do guideline (OECD 401), o teste possuía diferenças claras em comparação ao guideline N° 401, pois visava avaliar a toxicidade ao invés de mortalidade, entretanto naquele momento não houve substituição definitiva. Diante disso, em 1996, foi elaborado o Método de Toxicidade Aguda de Classe (ATC), representando o guideline N° 423 (OECD 423), adotada como segunda alternativa a diretriz N° 401. No entanto, apesar de racionalizar o uso animal, o objetivo final do teste ainda era avaliar a mortalidade frente a exposição as substâncias. E somente em 1998, surgiu o Teste “*Up and Down*” (UDP), representando a diretriz (OECD 425), cujo os objetivos são avaliar sinais de toxicidade, dose-respostas e estimar a DL_{50} .

Após consecutivas discussões sobre o teste da DL_{50} , cuja dose é capaz de causar mortalidade de 50% dos animais em experimentação, foram realizadas diversas modificações nas diretrizes 420, 423 e 425, as quais atualmente norteiam os testes de toxicidade aguda e contribuem para a identificação da toxicidade de novas substâncias, e estimativa da DL_{50} (OECD, 2008^a; ANVISA, 2013).

O Teste De Doses Fixas (OECD 420), o Método da Toxicidade Oral Aguda de Classe (OECD 423) e o Teste – “*Up and Down*” (OECD 425) foram efetivamente recomendados e adotados para avaliação toxicológica de substâncias. Apesar de apresentarem metodologias diferentes entre si, os objetivos dos 3 métodos são similares, conforme descrito na Tabela 5. Justifica-se que a escolha do método seja baseada nas evidências científica e esteja em conformidade com as agências regulatórias (CRETON et al., 2010; ANVISA, 2013).

Tabela 4. Classificação de substâncias baseado em critérios do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de produtos químicos após o teste de toxicidade oral aguda.

Toxicidade	Extrema	Alta	Moderada	Pouca	Improvável
Categoria	1	2	3	4	5
Dose em mg/kg	≤ 5	> 5 - 50	> 50 - 300	> 300 – 2000	> 2000 - 5000

Fonte: ANVISA (2016).

2.5.2 Delineamento experimental de toxicidade aguda

Visando racionalizar o uso de animais em pesquisas científicas, o delineamento experimental deste teste, objetiva avaliar o potencial tóxico agudo do Inf-L-At e é baseado na diretriz 425 “*Acute oral toxicity – Up and down procedure*” da OECD (OECD, 2008a) e com adaptações descritas por Traesel et al., (2017), sendo constituído por dois grupos experimentais: 1) Grupo controle (1 mL salina v.o), e 2) Grupo tratado (2000 mg/kg v.o).

Para definição da via de administração da amostra é necessário estabelecer uma análise comparativa com a forma que a espécie vegetal é consumida na medicina popular. Neste ensaio, para administração do Inf-L-At, opta-se pela via oral, com uso de sonda esofágica no tratamento dos animais, tendo em vista que a população faz uso dos chás derivados de plantas, por meio de ingestão.

A escolha do modelo animal de experimentação é determinada com base nas recomendações estabelecidas na diretriz 425 pela OECD (OECD, 2008a). Neste caso, utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, embora outras espécies de roedores também possam ser utilizadas em estudos similares, desde que selecionem para o delineamento preferencialmente as fêmeas, jovens, nulíparas, não prenhes e saudáveis, com aproximadamente 8 a 12 semanas de idade.

Tabela 5. Diretrizes da OECD e princípios norteadores para a avaliação de toxicidade oral aguda.

	Teste de Dose Fixa OECD 420	Toxicidade aguda de classe OECD 423	Teste “Up and down” OECD 425
Dose	5, 50, 300 e 2000 mg/kg – 5 animais por dose fixa	5, 50, 300 e 2000 mg/kg – 3 animais por dose fixa	Dose inicial estimada (175 mg/kg) fator de progressão de 3.2 – 1 animal / ou 2000 mg/kg – 1 animal – observação 48 horas.
Princípio	Identificar a menor dose que cause toxicidade	Identificar a menor dose que cause letalidade /mortalidade	Estimar DL ₅₀
Objetivo	1. Estimar a faixa da DL ₅₀ ; 2. Observar sinais da toxicidade oral aguda; 3. Analisar efeitos tóxicos nos órgãos - alvo.	1. Estimar a faixa da DL ₅₀ ; 2. Observar sinais da toxicidade oral aguda; 3. Analisar efeitos tóxicos nos órgãos - alvo.	1. Estimar a faixa da DL ₅₀ ; 2. Observar sinais da toxicidade oral aguda; 3. Analisar efeitos tóxicos nos órgãos - alvo.

OECD: *Organisation for Economic Cooperation and Development*; DL₅₀: Dose letal mediana. Fonte: Adaptado: Botham (2004).

Se houver estudos preliminares ou informações acerca da toxicidade da espécie, deve-se utilizar como limite do teste a dose de 2000 mg/kg. Posteriormente, a dose pretendida deverá ser administrada, um animal por vez, em conformidade com o protocolo de observação do primeiro animal tratado, e em sequência, outros quatro animais são separados para a administração da amostra, observação dos sinais de toxicidade e estimar a DL₅₀.

Caso não exista nenhum estudo de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* com a respectiva substância, a dose é iniciada em 175 mg/kg, e aplica-se o fator de progressão 3,2 na sequência de (1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750 mg/kg). (OECD, 2008a). Se o animal sobreviver à primeira dosagem administrada, subsequentemente ele é observado quanto os sinais de toxicidade por 24 horas. Após a análise, é recomendada a administração de dose superior a anterior seguindo o fator de progressão recomendado no protocolo. No entanto, caso ocorra o óbito do primeiro animal tratado, recomenda-se administrar dose inferior àquela realizada no primeiro roedor. Este fator, em associação a observação dos sinais clínicos possibilita a

estimativa da DL_{50} , acima da dose administrada quando não houver óbito. Seguidamente os roedores são observados periodicamente ao longo dos 14 dias de experimentação.

Diariamente os sinais clínicos e tóxicos são registrados e baseados nos cinco parâmetros do *screening* hipocrático conforme descrição na Tabela 6 (MALONE; ROBICHAU, 1962). Além da observação dos parâmetros hipocráticos, devem ser realizados monitoramentos no consumo hídrico e alimentar, pelo método de registro diário do peso da ração e do volume final da água disponível em cada gaiola. Além disso, deve ser registrado o peso corpóreo de cada animal. No 14º dia de experimentação todos os animais do grupo controle e grupo tratado deverão ser submetidos a eutanásia e autópsia macroscópica (ANVISA, 2013).

Tabela 6. Parâmetros do *screening* hipocrático proposto por Malone e Robichau (1962)

<i>Screening</i> hipocrático	
Parâmetros	Objetivo
1. Estado consciente	Avaliar a atividade geral do animal dentro da caixa
2. Atividade e coordenação do sistema motor	Identificar a presença ou ausência à resposta ao toque, ao aperto da cauda, ao endireitamento e a força para agarrar
3. Reflexos	Observar presença ou ausência de resposta ao estímulo auricular e corneal
4. Atividades sobre o sistema nervoso central	Identifica a presença ou ausência de tremores, convulsões, cauda em straub, sedação e/ou anestesia;
5. Atividade sobre o sistema nervoso autônomo	Observar a presença ou ausência de lacrimação, cianose, ptose, salivação e/ou piloereção

Fonte: o autor (2021).

2.6. Toxicogenética

A Toxicogenética, também conhecida como Genética Toxicológica, é uma área de estudo da Toxicologia responsável pela avaliação de efeitos genotóxicos produzidos por agentes físicos e químicos após exposição aguda ou crônica do organismo, resultando em possíveis danos às moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) (QUEIROZ et al., 2013; DE LIMA et al., 2016).

A avaliação da genotoxicidade causada pelo uso de determinadas substâncias, isolada de outros ensaios, não deve ser utilizada como padrão de medida de carcinogenicidade. Além disso, apesar dos estudos de genotoxicidade estarem frequentemente associados à medida inicial ou intermediária da tumorigênese, seus resultados subsidiam apenas a análise de tendência à carcinogenicidade proveniente do uso de substâncias naturais ou sintéticas (RIBEIRO, 2003).

São caracterizados como genotóxicos aqueles compostos, naturais ou sintéticos, que, em interações com o DNA, causam lesões estruturais ou funcionais as quais podem ou não se fixar no gene e gerar mutações. Essas lesões gênicas, por sua vez, são danos quantificáveis por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Ademais, as exposições crônicas aos agentes genotóxicos aumentam a probabilidade de iniciação de tumores (ANVISA, 2013; SALES et al., 2018).

Deve-se ressaltar também que os compostos considerados genotóxicos nem sempre são mutagênicos, pois lesões gênicas são passíveis de correção pelo sistema de reparo do DNA. Entretanto, todos compostos que causam mutação gênica são, obrigatoriamente, genotóxicos (HAYASHI et al., 1990; DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Com base em seus efeitos, os agentes genotóxicos são classificados em: 1) Genotóxicos ou agentes indutores de danos no DNA; 2) Mutagênicos ou agentes indutores de lesões gênicas e mutações gênicas; 3) Carcinogênicos ou agentes indutores de câncer; e 4) Teratogênicos ou agentes indutores de anomalias congênitas (NATARAJAN, 1993; SAKS et al., 2017; TRAESEL et al., 2017).

Assim, tendo em vista as associações estabelecidas entre mutações com a instabilidade genômica, o desenvolvimento do câncer e doenças congênitas, descritas em inúmeros estudos, as agências regulatórias FDA, EMA e a ANVISA preconizaram o desenvolvimento dos testes de genotoxicidade para avaliar o provável risco no consumo de novas substâncias, e contribuir para prospecção de novos fármacos ou fitoterápicos (RIBEIRO, 2003; ANVISA, 2013).

Usualmente, os ensaios biológicos são indicadores genotóxicos, pois quantificam e qualificam as lesões gênicas, a mutação gênica, e os danos cromossômicos (BARBISAN et al.,

2003; RIBEIRO, 2003). Entre os ensaios mais usuais para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade, destacam-se o teste Ames, o Ensaio do Cometa (HARTMANN et al., 2003; GONTIJO; TICE, 2003; TICE et al., 2003; SPIVAK et al., 2009; SPIVAK, 2015), o Ensaio de micronúcleo em sangue periférico (HAYASHI et al., 1990), o Teste de Micronúcleo em medula óssea (HAYASHI et al., 1990) e o teste SMART, que investigam não somente a mutagenicidade, mas também a atividade recombinogênica (GRAF & VAN SCHAİK, 1992).

Outrossim, diversos estudos demonstraram que ensaios biológicos de outras áreas são considerados complementares aos testes clássicos da toxicogenética (ROVOZZO; BURKE, 1973; ISHII et al., 2011; MAURO et al., 2011). Entre eles, destacam-se o ensaio de apoptose, de fagocitose esplênica e a contagem diferencial de leucócitos, os quais permitem uma avaliação dos efeitos imunomodulatórios em resposta à exposição aos novos compostos (BRAIT et al., 2015; ARAUJO et al., 2017).

2.7. Ensaios biológicos

2.7.1. Teste de Ames

O teste de Ames foi desenvolvido para detecção de agentes químicos capazes de induzir mutações gênicas no organismo em exposição (AMES et al., 1971). Todavia, ao longo dos últimos anos, observou-se a tendência na qual diversas pesquisas empregam o teste para avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais ou produtos naturais, fato corroborado pela ampla busca por plantas com propriedades terapêuticas. Tais evidências também são descritas em estudos de Sponchiado e colaboradores (2016), justificando a importância do modelo na avaliação mutagênica para a prospecção de novos medicamentos.

Paralelamente, o teste também é conhecido como teste de Salmonella/microsossoma, sendo um dos principais métodos para investigar a mutagenicidade in vitro. Esse teste, que emprega as linhagens de *Salmonella* entérica (*Salmonella Typhimurium*), é utilizado recorrentemente em pesquisas e validado pelas agências regulatórias em todo o mundo (GRIFFITHS et al., 2006).

Entre as linhagens mais usuais, diversos autores enfatizam o uso de TA98 e TA100, pois são derivantes da parental LT-2, possuem características auxotróficas para histidina (*his-*) e, principalmente, são construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA, além de outras mutações adicionais (MARON; KATZENELLENBOGEN; AMES, 1981; MARON; AMES, 1983; GRIFFITHS et al., 2006).

Nesse sentido, devido à auxotrofia para (*his*-), as linhagens de *S. Typhimurium* são incapazes de se desenvolver e formar colônias na ausência do respectivo aminoácido. No entanto, quando são expostas a substâncias mutagênicas, conseqüentemente restauram as funções de genes do *operon* e propiciam a síntese de histidina. Nesta exposição, as células lesionadas crescem e formam colônias, mesmo que não haja presença constante de (*his*-) (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Além das mutações nos genes do *operon*, que é responsável pela inibição da biossíntese de histidina, também foram desenvolvidas outras mutações adicionais nas diferentes linhagens. Tais características podem assegurar a versatilidade do amplo uso do teste de Ames e garantir maior sensibilidade para avaliação de mutagenicidade. Entre estas mutações adicionais, destacam-se a mutação *rfa*, a deleção *uvrB* e a inserção dos plasmídios pKM101 e paQ1 (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Ainda nesse contexto, dentre outras adaptações feitas para realização do teste de Ames, uma das mais importantes foi a inclusão do sistema de metabolização exógena, pois as linhagens de *S. Typhimurium* são consideradas incapazes de metabolizar compostos químicos via citocromo P450 e ativá-los como comumente ocorre em mamíferos (AMES et al., 1973). Enzimas do citocromo P450 se expressam normalmente no fígado, e por esse motivo, no teste de Ames, pode ser utilizado o homogenato da fração microsomal S9 extraída do fígado de rato da linhagem *Sprague-Dawley*, após tratamento com solução de bifenil policromida, desencadeando o aumento desta enzima no fígado. Nesta perspectiva, o teste de Ames pode ser realizado na presença (+ S9) e ausência (- S9) de sistema de metabolização exógena, viabilizando a análise e diferenciação entre compostos de ação direta e indireta (AMES et al., 1973).

2.7.2. Ensaio do cometa

Por inúmeras vezes, os seres vivos são expostos a substâncias químicas, agentes físicos e biológicos, sendo que, em consecutivas exposições, estes agentes exógenos interagem com o material genético das células. Como resposta destas interações, surgem as lesões gênicas que, em termos genéticos, são distintas das mutações gênicas (TIAN et al., 2015).

Deve-se enfatizar que o sistema de reparo do DNA age antes que as lesões se fixem no material genético. No entanto, ainda há possibilidade de erros nos reparos, e frente a essa

possível ineficiência, os danos podem se tornar permanentes. Com isso, podem ser causadas mutações gênicas na célula mãe e, subsequentemente, afetarem-se as células filhas. Neste caso, são ativadas cascatas de mecanismos moleculares para eliminação dos danos no gene por fagócitos ou por apoptose (MAURO et al., 2011; TIAN et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017; TRAESEL, et al., 2017).

Neste sentido, quantificar as lesões gênicas auxilia na compreensão de propriedades das substâncias químicas, dos agentes físicos e biológicos, incluindo a possibilidade de avaliação do uso seguro das plantas de uso popular, contribuindo então para a elucidação dos efeitos colaterais e do potencial genotóxico (OECD, 2016a).

Para tanto, tem-se o ensaio do cometa, ou “SGC - *Single Cell Gel assay*”, que possui alta confiabilidade e é amplamente aceito em diversas pesquisas, pois representa uma técnica simples, rápida, versátil, robusta e de baixo custo. Além disso, seu protocolo pode ser executado em menos de 24 horas, sendo utilizado em diversas pesquisas, como em biomonitorização (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2012; COLLINS et al., 2014; COLLINS, 2015), ecotoxicologia (FRANCISCO, et al., 2018), engenharia genética (LANGIE et al., 2011; HUK et al., 2015), epidemiologia molecular (KRUSZEWSKI et al., 2012), genética médica e genética toxicológica (DA SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES; 2003; ARALDI et al. 2015).

O protocolo estabelecido para o ensaio do cometa pode ser realizado com todos os tipos de células eucariontes, especialmente animais, embora muitas técnicas para padronização deste ensaio tenham surgido para análise de lesões genômicas em células vegetais - o *Allium cepa* ainda é o método alternativo mais eficaz, por exemplo, (SOUZA et al., 2020). Este ensaio é desenvolvido em pH alcalino, de forma que as células são depositadas em lâminas previamente recobertas por gel de agarose, responsável pela imobilização das células depositadas. As estruturas lesionadas do DNA, nesse momento, ainda estão compactadas e superenroladas, mesmo que tenham ocorrido quebras simples, sítios lábeis alcalinos e *crosslinks* resultantes do potencial genotóxico da substância teste.

Após o depósito em solução de lise para prevenção da hemólise, as lâminas seguem para o tampão alcalino, onde ocorre a desnaturação e liberação das histonas. Assim, posteriormente, torna-se possível o relaxamento para o desdobramento da dupla fita de DNA e exposição das porções lesionadas. Dessa maneira, em meio à eletroforese, os danos (clastogênicos) migram no sentido oposto ao nucleóide e em direção ao cátodo (Figura 11). Esse arraste forma uma estrutura similar a um cometa, característica tal que subsidia o nome da técnica (SINGH et al., 1988).

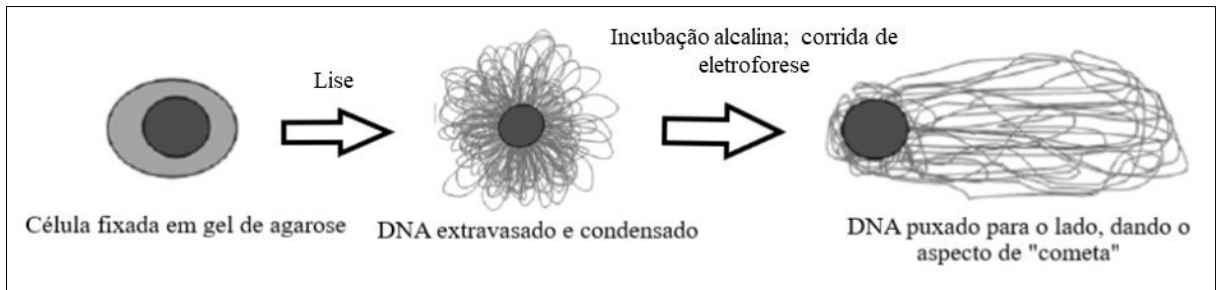


Figura 11. Células submetidas a solução de Lise e corrida de eletroforese. Fonte: Mezzalira, Funchal, Dani (2014).

Ademais, deve-se ressaltar que são analisadas um total de 100 células por animal/lâmina. Inicialmente, faz-se uma análise quantitativa, avaliando a quantidade de células com danos e confirmando-se a presença de cometas. Com isso, estes são classificados em: (Classe 0) células não danificadas que não mostram nenhuma cauda; (Classe 1) células com tamanho de cauda inferior ao diâmetro do nucleóide; (Classe 2) células com tamanho da cauda 1-2 vezes o diâmetro do nucleóide; e (Classe 3) células com tamanho de cauda maior do que duas vezes o diâmetro do nucleóide. Tal classificação tem relevância, pois o tamanho da cauda é proporcional à quantidade de danos (Figura 12), apesar de a quantificação de fragmentos em software estar diretamente relacionada à qualidade e às condições da eletroforese (TRAESSEL et al., 2017).

Outro dado calculado é o score por grupo, que é determinado com base na soma da quantidade total de danos vezes a respectiva classe à qual foi qualificado (SINGH et al., 1988). A descrição metodológica deste ensaio, em sua versão de pH alcalino, fomentou a avaliação do potencial genotóxico do Inf-L-At em Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs- Peripheral Blood Mononuclear Cells) em ratos Wistar em tratamento agudo, e consta na íntegra no Artigo III.

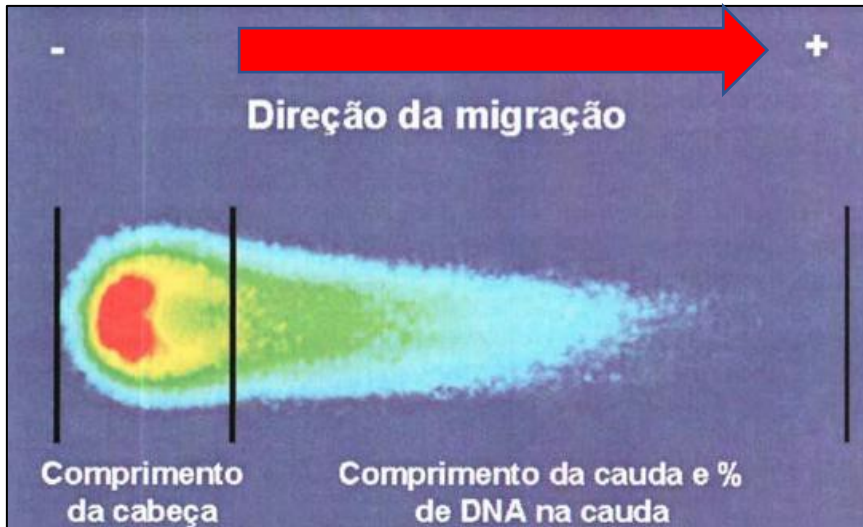


Figura 12. DNA após exposição a eletroforese, com estrutura subdividida em nucleóide intacto e cauda em tamanho proporcional às lesões gênicas. Fonte: Gontijo, Tice (2003).

2.7.3. Ensaio de micronúcleo

Exposições agudas ou acumulativas a agentes químicos, físicos e biológicos podem causar danos no DNA, e quando não há um mecanismo de reparação eficiente, originam-se mutações gênicas, as quais, em acumulações progressivas ao longo dos ciclos de reprodução celular, representam um dos fatores de iniciação e desenvolvimento do câncer (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Nesse contexto, o termo micronúcleo surgiu em 1951, com a descoberta de fragmentos acêntricos produzidos durante os estágios tardios da anáfase e eliminados pelo núcleo, sendo também descritos como corpúsculos de *Howell-Jolly* (KRISHNA; HAYASHI, 2000). São formados basicamente por meio de rupturas cromossômicas (clastogênese) ou pelo bloqueio do fuso mitótico, cujo evento é a aneugênese.

O ensaio de micronúcleo é um indicativo de mutagenicidade e da tendência carcinogênica das substâncias, pois detecta quebras cromossômicas e aneuploidia resultantes da exposição exógena (ARALDI et al., 2015). Dessa maneira, é amplamente recomendado pelas agências internacionais e institutos governamentais (OECD, 2016b), e compõe a bateria de testes para avaliação toxicogenética *in vivo* e *in vitro* de novas substâncias. Isso se dá especialmente quando há relevância no uso popular ou evidências de propriedades farmacológicas, medicinais ou nutricionais (HAYASHI et al., 1990), além de ser indispensável para o registro de produtos químicos ou novos fármacos (ARALDI et al., 2015).

Em associação a compostos mutagênicos como os quimioterápicos, outros dois mecanismos podem ser avaliados: 1) Potencialização dos efeitos mutagênicos dos fármacos de referência; e 2) Ação antimutagênica, com redução do potencial mutagênico dos respectivos quimioterápicos. Ambos mecanismos contribuem para investigação dos efeitos quimiopreventivos de novos fármacos (HAYASHI et al., 1990; ARAÚJO, et al., 2017).

O ensaio tem como base o processo de formação de eritrócitos, denominado eritropoiese, que ocorre na medula óssea e baço de roedores adultos. Fisiologicamente, em aproximadamente 6 horas após a mitose, a fase de eritroblastos ortocromáticos expulsa o núcleo e origina os eritrócitos policromáticos (PCEs). Posteriormente, estas células sofrem maturação, e a partir delas surgem os eritrócitos normocromáticos (NCEs).

No que concerne o presente trabalho, o desenho experimental para avaliação do potencial mutagênico do Inf-L-At é baseado no protocolo “*Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*” (OECD, 2016b). Além disso, a condução do ensaio ocorre de modo semelhante ao ensaio cometa, ambos os ensaios fazem parte do delineamento experimental em toxicogenética proposta para esta pesquisa. Em suma, animais de ambos os sexos são randomizados em cinco grupos, sendo dois grupos controles e três grupos teste, em tratamento agudo por três dias consecutivos com as diferentes doses do Inf-L-At.

Ao final do período de tratamento, a extração da medula óssea dos animais ocorre a partir do fêmur, e após a confecção das lâminas e coloração com Giemsa (GOLLAPUDI; KAMRA, 1979), são analisadas 2000 células totais (Figura 13). A investigação subsequente da frequência de MPCEs (eritrócitos policromáticos micronucleados) propicia a avaliação mutagênica. Além disso, determina-se o potencial citotóxico por meio da relação estabelecida entre o número de PCEs e NCEs.

O ensaio de micronúcleo em sangue periférico também é aplicado para elucidação dos efeitos temporais e imunomodulatórios envolvidos em possíveis eliminações de mutações. Nesta fase experimental são coletados 20 µl de sangue periférico por animal em três tempos distintos (24 horas; 48 horas e; 72 horas) após a primeira administração do Inf-L-At. As lâminas são previamente preparadas com alaranjado de acridina e utilizadas durante o ensaio (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983; HAYASHI et al., 1990).

Este corante possui sua função intercalante, pois quando interagem com moléculas de DNA, sua fluorescência se apresenta em verde-amarelo e, quando intercala com RNA, sua fluorescência torna-se vermelha, o que facilita a identificação dos micronúcleos (Figura 14) (HAYASHI et al., 1990).

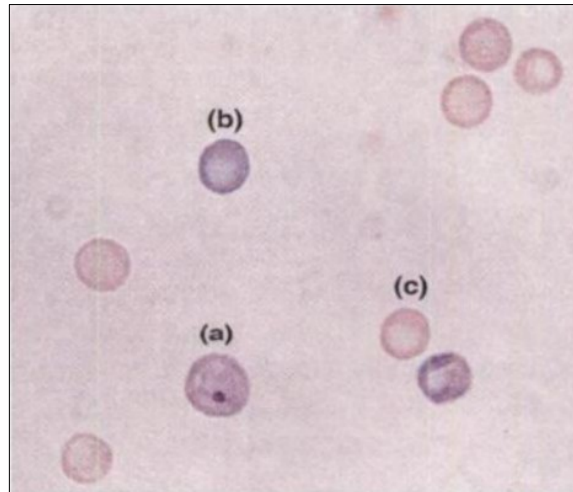


Figura 13. Eritrócitos extraídos da medula óssea, submetidos a coloração por Giemsa: (a) Eritrócito policromático micronucleado, (b) eritrócito policromático normal e (c) eritrócito normocromático. Fonte: Ribeiro, Salvadori, Marques (2003).

Por fim, vale ressaltar que a associação de ambos os testes (micronúcleo e cometa) é considerada padrão-ouro em genética toxicológica, pois estes são eficientes quanto ao poder estatístico, à versatilidade, ao baixo custo, e à agilidade na obtenção dos resultados.

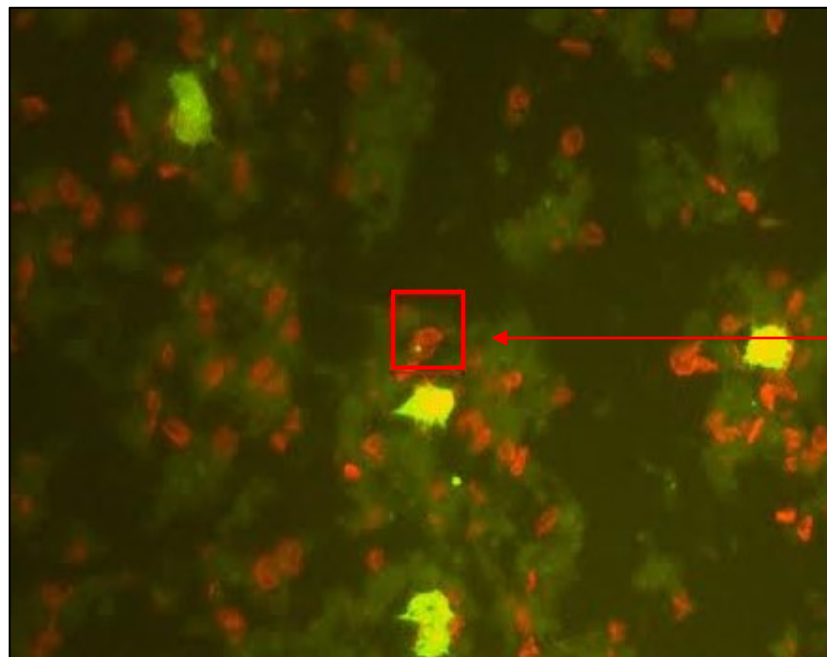


Figura 14. Eritrócito policromático micronucleado no sangue periférico. Fonte: o autor (2020).

2.7.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

Modelos alternativos são efetivamente aplicados em diversas áreas de pesquisa, como em toxicologia e farmacologia, e possuem maior aceitação ética, pois são representados por pequenos animais não-mamíferos como nematódeos (*Caenorhabditis elegans*), peixe-zebra (*Danio rerio*) e moscas (*Drosophila melanogaster*). Estes modelos dispensam aprovação do comitê de ética e podem ser implantados com facilidade em pequenos laboratórios, exigindo pouca estrutura e baixo investimento. Além disso, são eficientes, versáteis e apresentam reprodução rápida, com ampla utilização na condução de ensaios de genotoxicidade (GLAVIS-BLOOM; MUHAMMED; MYLONAKIS, 2012).

Dentre esses modelos, o teste SMART é realizado com uso da espécie *Drosophila melanogaster*, típico invertebrado da classe Insecta conhecido como mosca-da-fruta. Apresenta anatomia complexa, tamanho pequeno e ciclo de vida curto, com aproximadamente 10 dias de diferença entre a sua forma de ovo à forma fértil (Figura 15 e 16).

A utilização de linhagens de *Drosophila melanogaster* ocorreu após 1910, com a teoria cromossômica da herança genética, desenvolvida por Thomas Morgan, cuja pesquisa a partir de cruzamentos entre *D. Melanogaster* identificou o gene White, e serviu de base para definir que os cromossomos são portadores de genes (GLAVIS-BLOOM; MUHAMMED; MYLONAKIS, 2012).

Segundo Hoffmann, (2003) e Lemaitre, (2004), a espécie de *D. melanogaster* apresenta sofisticada resposta imune inata, com genes e vias semelhantes às de mamíferos. Estas características atribuídas à *D. melanogaster* são predileção para avaliação genotóxica de plantas medicinais. Por meio dele, é possível analisar mutações gênicas, deleção e recombinações, além de analisar especificamente a perda de heterozigosidade frente a exposições a agentes genotóxicos (GRAF et al., 1984; VOGEL et al., 1998; FRAGIORGE et al., 2008).

Para tanto, o teste SMART tem como princípio básico a proliferação de grupos celulares de discos imaginários durante a mitose. Conseqüentemente, após exposição a substâncias genotóxicas, a provável alteração genética surge em células do disco imaginal que irá originar a asa e posteriormente, são formados clones de células mutadas, expressos em manchas distribuídas na superfície das asas das moscas (Figura 17 e 18) (GRAF, 1995). Ademais, o teste SMART se mostra eficiente para avaliar a genotoxicidade (mutação e

recombinação), a biotransformação e os potenciais antigenotóxicos (ABRAHAM; GRAF, 1996; YUN et al., 2000).



Figura 15. *Drosophila melanogaster*, porção em destaque indicando o apêndice sexual de machos separados com auxílio de microscópio estereoscópio binocular (Lupa). Fonte: o autor (2000).

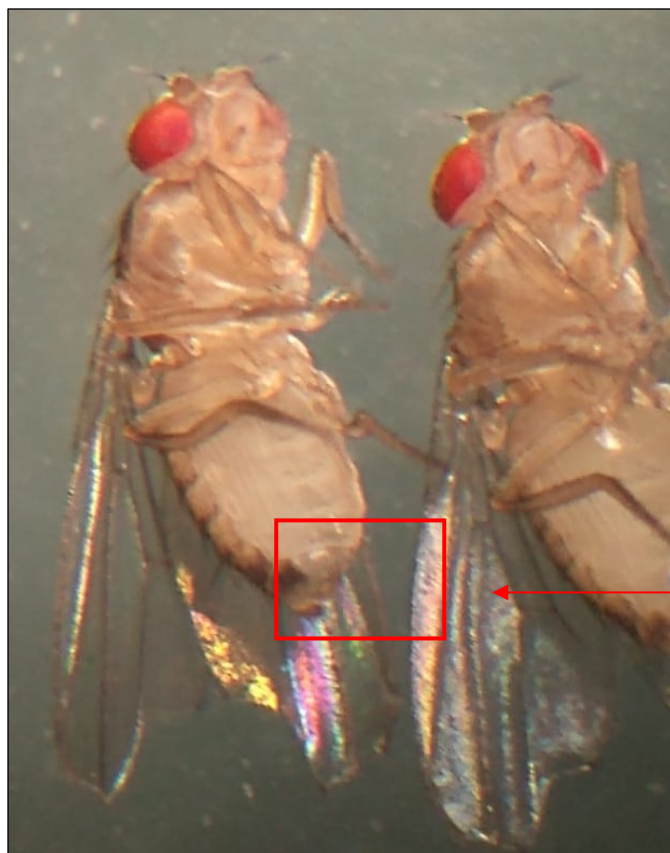


Figura 16. *Drosophila melanogaster*, porção em destaque indicando o apêndice sexual de fêmeas separadas com auxílio de microscópio estereoscópio binocular (Lupa). Fonte: o autor (2000).

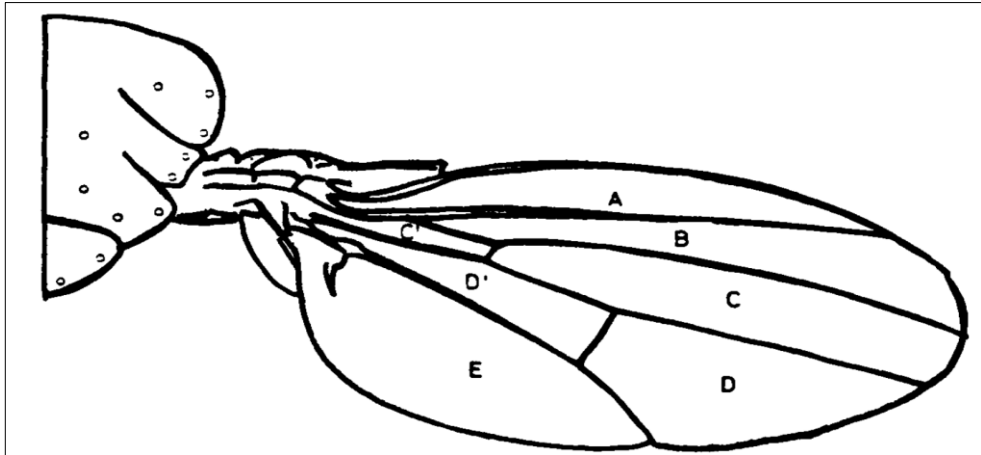


Figura 17. Superfície da asa de *Drosophila melanogaster*, dividida em setores de A, B, C, D e E. Fonte: Graf et al. (1984).

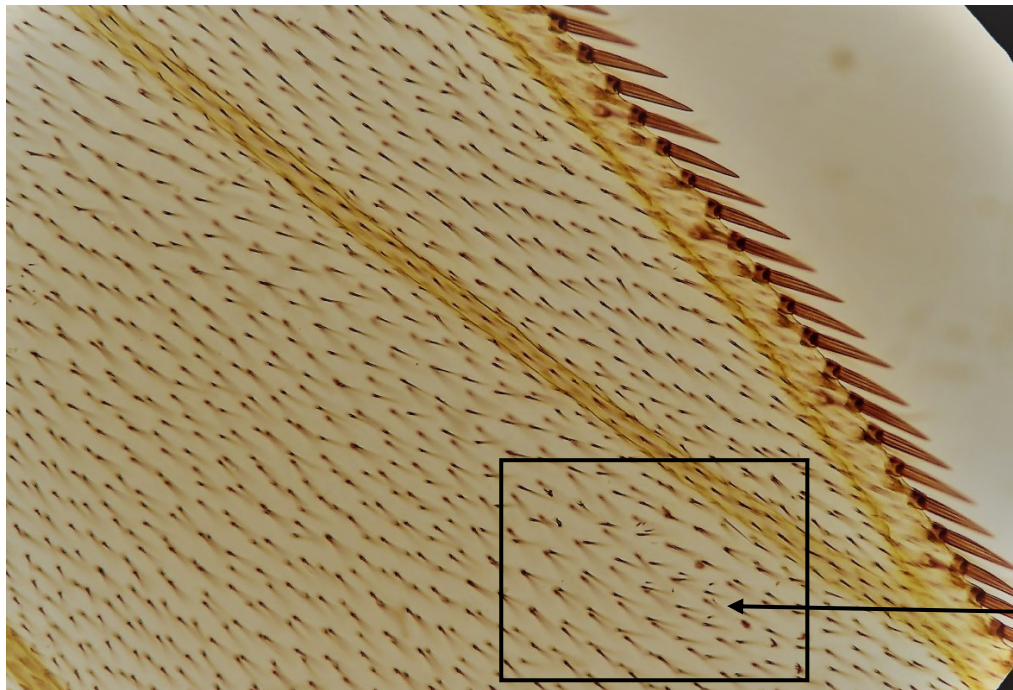


Figura 18. Fragmento do setor A e B na superfície da asa, manchas gêmeas com pelos *flr³* e tricomas *mwh*. Fonte: o autor (2020).

Assim, nesta pesquisa, o teste SMART é realizado por meio de cruzamentos entre três linhagens mutantes de *D. melanogaster*, portadoras dos seguintes marcadores recessivos das células das asas: *multiple wing hairs (mwh, 3-0,3)* e *flare-3 (flr³, 3-38,8)*: [1] linhagem *multiple wing hairs (mwh)*, com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem *flare3*, com constituição genética *flr³ / In (3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; [3] linhagem Oregon R, *flare-3*,

com constituição genética *ORR; flr³ / In In (3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34c} e Bd^S* (Figura 19).

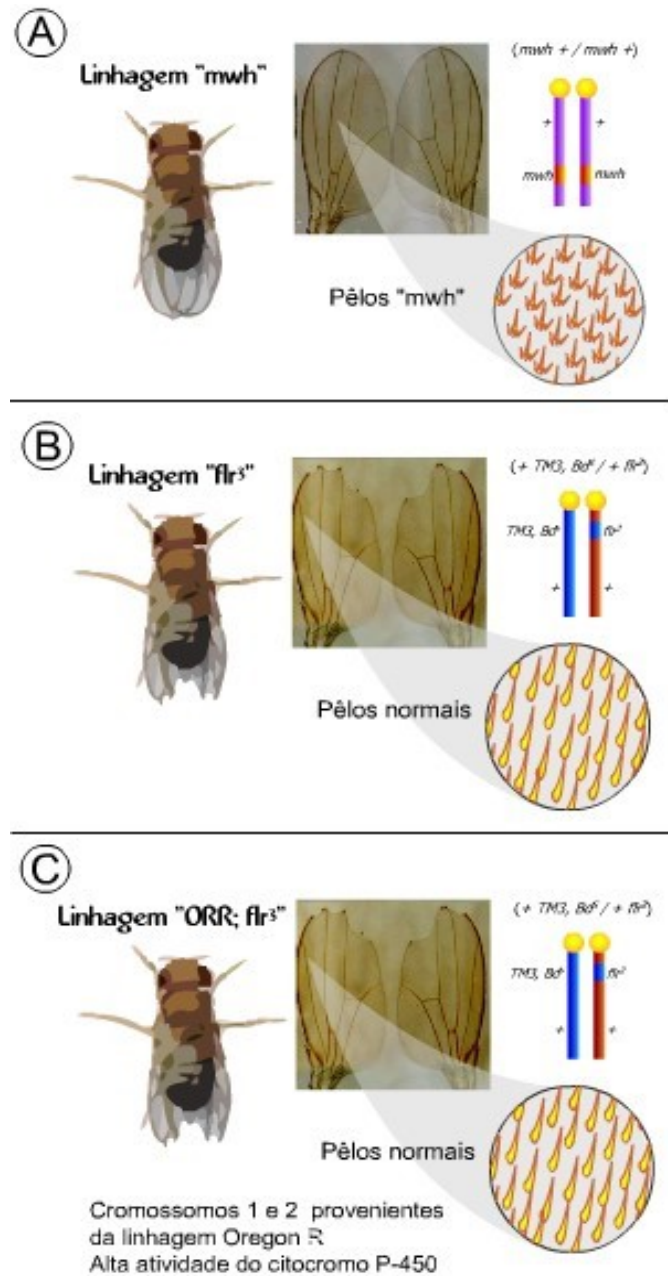


Figura 19. Caracterização das linhagens de *D. melanogaster*, morfologia da asa; estrutura do par de cromossomos 3, com posição dos genes mutantes; e características dos pelos das linhagens *mwh* (A), *flr³* (B) e *ORR/flr³*. Fonte: Valadares (2000).

O marcador *flr³* em homozigose é letal, por isto foi desenvolvido um cromossomo balanceador *TM3, Bd^S* (*Third Multiple 3, beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem. A presença deste balanceador torna inviável a recombinação, entre cromossomos homólogos, devido à presença de múltiplas inversões neste cromossomo. A indução da perda de heterozigose destes marcadores nas células dos discos imaginais da larva, por tratamento com compostos genotóxicos, leva a formação de clones de células mutantes, os quais se expressam, após a metamorfose, em mancha mutante na asa (GRAF et al., 1984).

Com essas linhagens, são realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST-standard cross) entre machos ‘*mwh*’ e fêmeas virgens *flr3* (GRAF et al., 1984), e 2) cruzamento de alta bioativação (HB- high bioactivation cross) entre machos ‘*mwh*’ e fêmeas virgens *ORR/flr3* (GRAF & VAN SCHAİK, 1992). A linhagem ORR possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R(R), resistente ao DDT, contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização, citocromo P-450. Ambos os cruzamentos produziram indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH), com constituição genotípica *mwh/flr3*, e indivíduos heterozigotos balanceados (BH), constituídos por *mwh/TM3, Bds*, caracterizados pelo aspecto fenotípico de asas com bordas recortadas (*serrate*) (Figura 20). O protocolo de tratamento é conduzido conforme estudos recentemente publicados, com metodologia descrita na íntegra no Artigo II em anexo.

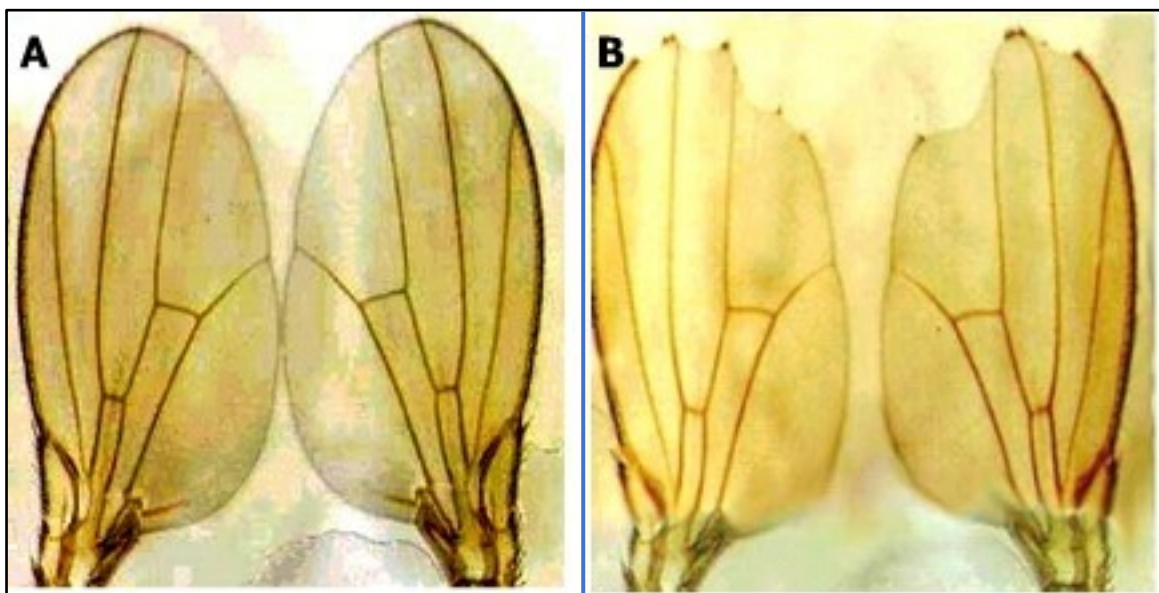


Figura 20. Fotografias de pares de asas de *D. melanogaster*: **A** – Asas com bordas lisas; característica dos indivíduos da linhagem “*mwh*”, herdada pelos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH); **B** – Asas com bordas recortadas (*serrate*); característica dos indivíduos das linhagens “*flr3*” e “*ORR; flr3*” e herdada pelos descendentes heterozigotos balanceados (BH). Fonte: Valadares (2020).

2.7.5. Ensaio imunomodulatório

Diversos metabólitos ativos nas plantas são considerados recursos naturais promissores para prospecção de novos fármacos e fitoterápicos. Entretanto, a ausência de estudos sobre os mecanismos de ação de agentes químicos, frente à complexidade do sistema imunológico, pode comprometer o uso clínico destes recursos e seus derivados, principalmente pelas limitações em pesquisas imunomodulatórias (MAKARE et al., 2001).

O sistema imunológico é caracterizado pela complexidade na cooperação estabelecida com os demais sistemas no corpo, além de sofisticação na resposta de defesa para homeostase do organismo, envolvendo diversos componentes moleculares e celulares durante seu funcionamento (ABBAS, 2008; JUNIOR et al., 2020). Assim como as moléculas endógenas são capazes de controlar invasões de agentes exógenos e patógenos, também são capazes de distinguir as partículas do próprio organismo daquelas oriundas do meio externo (TIZARD, 1998; ABBAS, 2001).

Conceitualmente, a resposta imune pode ser dividida em: 1) imunidade inata, que representa respostas rápidas a estímulos moderados, sem necessidade de ativação. Ocorre independente de contato prévio com imunógenos ou patógenos, e também não sofre alteração quanti-qualitativa frente à exposição, sendo caracterizada pelas barreiras biológicas, físicas e químicas, pelas células especializadas e pelo sistema fagocítico; e 2) imunidade adaptativa, que, em contraposição à imunidade inata, é caracterizada pela dependência de células especializadas e de moléculas solúveis oriundas dos linfócitos, como as aminas e peptídeos vasoativos, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas, envolvidas na ativação da resposta. Possui ampla especificidade, com reconhecimento de memória e especialização de resposta (MACHADO et al., 2004; CRUVINEL et al., 2010).

Entre os principais mecanismos de resposta da imunidade inata, destacam-se a fagocitose, a produção e liberação dos mediadores inflamatórios, e a síntese das proteínas citocinas e quimiocinas. Tais mecanismos são ativados pelas células efetoras, classificadas em macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e Natural Killer (NK) (JANEWAY, 2000; CRUVINEL et al., 2010; MEDZHITOV).

A ativação da imunidade inata não é dependente somente dos linfócitos. Nesta resposta imunológica, as células apresentadoras de antígenos (APCs) também exercem papel essencial para o início do processo, por meio do mecanismo de apresentação de antígenos em associação ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) (DELVES; ROITT, 2000).

Em comparação, ambas respostas imunes são constituídas por células típicas, com funções reguladoras e responsáveis pela ativação ou supressão das respostas imunológicas. Esta relação também é conhecida como autorregulação e ocorre após a liberação de imunomoduladores (HOLLAND & VIZI, 2002; MACHADO et al., 2004). Com a ativação de respostas imunes por meio de exposição aos agentes exógenos, o organismo reage com a liberação destes imunomoduladores, que podem apresentar efeitos inibitórios, estimulatórios, ou então agir simultaneamente, estimulando algumas células do sistema imune e suprimindo outras (DE OLIVEIRA; NUNES-PINHEIRO, 2013).

Neste contexto, pesquisas com imunomoduladores tornam possível a manipulação do sistema imunológico, na tentativa de assegurar homeostase e reduzir efeitos adversos oriundos de terapias farmacêuticas, doenças neurodegenerativas ou tumores (DUTTA, 2002). Em síntese, entre os principais eventos imunomodulatórios, destacam-se a fagocitose, a ativação de leucócitos e a apoptose, que constituem as principais etapas da resposta imunológica inata (ABBAS et al., 2001).

2.7.5.1. Contagem diferencial das células do sangue

Os leucócitos são células brancas presentes no tecido sanguíneo e atuam no sistema imunológico. São subdivididos em tipos celulares com especificidade distintas para a defesa do organismo e caracterizadas especialmente pela capacidade de gerar memória imunológica para modular a resposta imune mediante as exposições aos imunógenos e patógenos (WANG, et al., 2015).

Diante disso, este ensaio é realizado por meio da metodologia de contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue (Figura 21), sendo estes: i) neutrófilos, que atuam como a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos após o surgimento de lesões. São recrutados para impedir infecções causadas pelos agentes exógenos e também são responsáveis pela morte do patógenos e retirada dos danos via fagocitose (MAYADAS et al., 2014); ii) eosinófilos, típicos leucócitos com ação mediadora em processos inflamatórios associados a alergias e reação a verminoses, além de sintetizar citocinas e quimiocinas para auxiliar na reparação em lesões teciduais (MAZZEO et al., 2015); iii) basófilos, que representam o menor número de leucócitos circulantes e são células efectoras de reações de hipersensibilidade envolvidas na produção de histaminas (GALLI, 1993); iv) monócitos, células dependentes de fatores de transcrição que estão envolvidas na sua produção e ativação, além de originarem os macrófagos e poderem participar do processo de fagocitose (TAMURA

et al., 2015); e v) linfócitos, que em roedores são os leucócitos em maior proporção e são responsáveis pela defesa do organismo, apresentando-se em três tipos básicos - linfócitos B, linfócitos T e células NK.

A contagem diferencial dos leucócitos subsidia a interpretação do funcionamento do estado imunológico após a exposição, além de ser amplamente indicada para investigação de alergias, infecções e outras doenças hematológicas em mamíferos (REZATOFIGHI; SOLTANIAN-ZADEH, 2011; ZON, 1995; ISHII et al., 2011; ARAÚJO, et al., 2017).

Para a condução do ensaio de imunomodulação, os mesmos animais delineados para o ensaio do cometa e de micronúcleo, também serão utilizados no respectivo ensaio, posteriormente, uma gota de sangue periférico é extraída de cada roedor, para a confecção de lâminas histológicas por meio da extensão sanguínea e, 24 horas depois, as respectivas lâminas são submetidas a coloração com azul de metileno e eosina, dissolvidos em metanol.

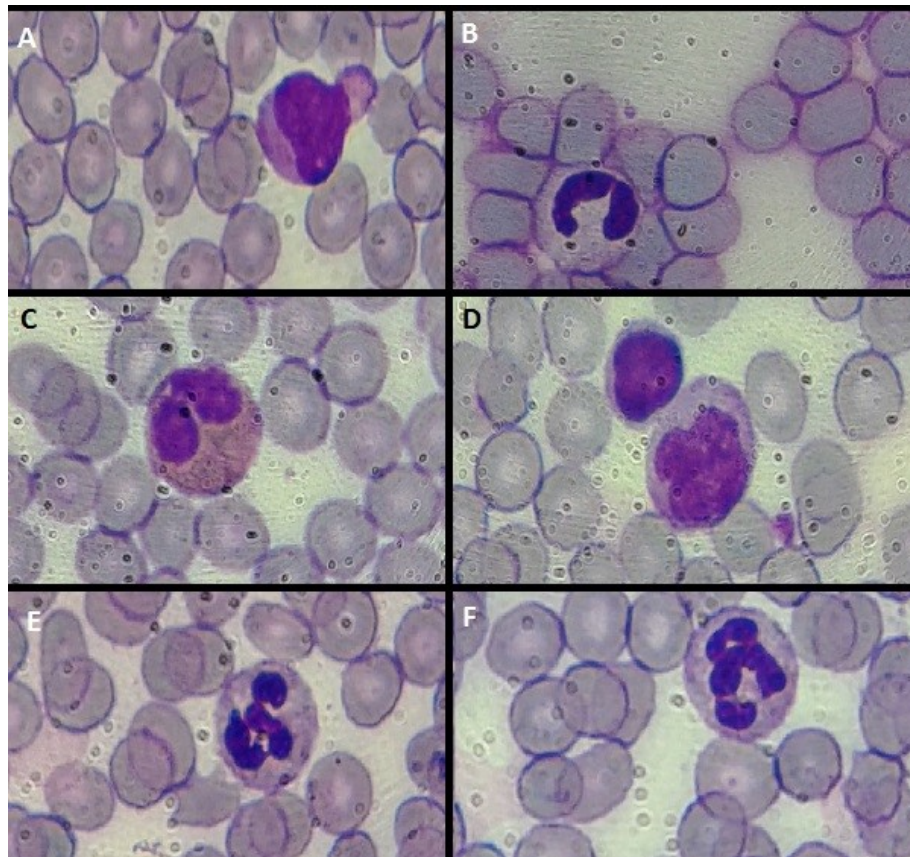


Figura 21. Leucócitos e hemácias do sangue periférico; A – linfócito; B- neutrófilo; C- eosinófilo; D- linfócito e monócito; E e F- neutrófilos. Fonte: o autor (2020).

A pigmentação celular ocorre de acordo com o pH, o que permite a diferenciação morfológica dos subtipos de leucócitos. Por fim, quantifica-se um total de 100 células/ animal com o auxílio de microscopia de campo claro com aumento de 400 vezes (ISHII et al., 2011).

2.7.5.2. Fagocitose esplênica

O baço é um órgão abdominal côncavo com estrutura complexa, envolvido na filtração do sangue, na seleção de leucócitos viáveis e na remoção de células lesionadas por meio do mecanismo de fagocitose. Em neonatos, possui função hematopoiética, enquanto que, em adultos, contribui na manutenção de anticorpos e linfócitos dos tipos B e T (FREITAS et al., 2009; ARAÚJO et al., 2017).

Dentre os subtipos de leucócitos, os macrófagos e neutrófilos são especializados em englobar partículas, lesões e patógenos e retirá-los das células e tecidos com o auxílio de sua capacidade fagocitária, com presença de receptores específicos para reconhecimento de antígenos (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Estes receptores se fixam na superfície das partículas, com sobreposição da membrana celular sobre os resíduos causadores dos danos, onde atuam filamentos de actina, e circundam a partícula englobada. Por fim, através das proteínas contráteis, formam a vesícula fagocítica, cujo armazenamento ocorre no interior celular (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A fagocitose é a primeira linha de defesa do organismo, propiciando a eliminação de células com lesões gênicas, como as células micronucleadas (ISHII et al., 2011). Neste ensaio, a determinação de evidência ou não de fagocitose é baseada segundo a descrição de Hayashi et al. (1990), em que é realizada a maceração do baço para a obtenção de suspensão celular homogênea. Para a confecção e coloração prévia das lâminas, é utilizado o alaranjado de acridina (1mg/mL), e após a deposição da suspensão celular sobre a lâmina, estas são estocadas em *freezer* até a análise. Este ensaio é quali-quantitativo, analisando-se 200 células por animal. A ausência ou presença de fagocitose é baseada na descrição de Hayashi *et al.* (1990), e é realizada por intermédio de microscopia de fluorescência com objetiva de 400 vezes (Figura 22) (ISHII et al., 2011).

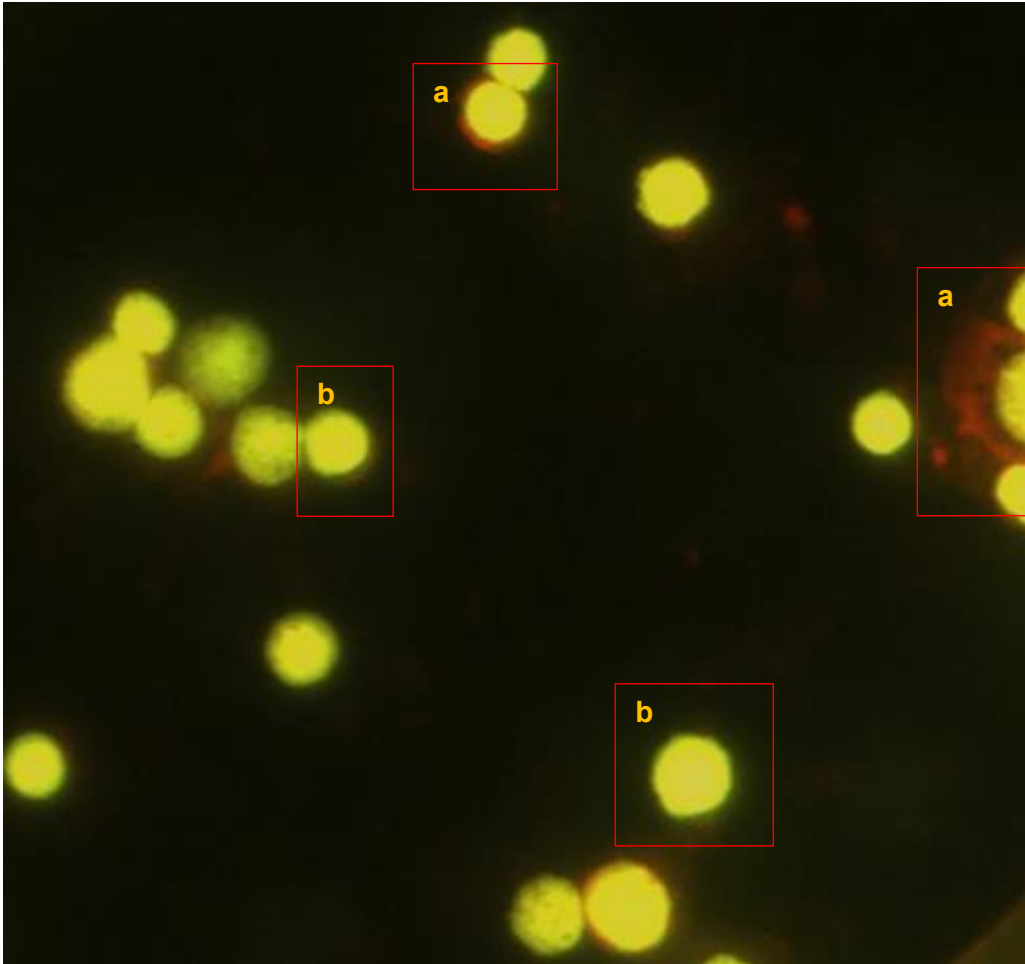


Figura 22. Leitura de fagocitose. a) Evidencia de fagocitose, b) Sem evidencia de fagocitose. Fonte: o autor (2020).

2.7.5.3. Apoptose

A apoptose é um dos mecanismos de eliminação de células que possuem alterações fisiológicas ou lesões gênicas que possam desestabilizar a homeostase orgânica. Tradicionalmente, é conceituada como via de morte celular programada, sendo mediada pela ativação de enzimas caspases (KUMAR et al., 2010; MACHADO et al., 2013). Esse processo possibilita a eliminação de lesões do DNA, pois, caso o sistema de reparo do DNA seja ineficiente, a própria célula sinaliza eventos intrínsecos indutores de apoptose (MACHADO et al., 2013).

No início da apoptose, o citoplasma é condensado e o núcleo sofre compactação, de forma que, posteriormente, a fragmentação do material genético ocorre em subunidades denominadas oligômeros (SIEGEL et al., 1999). Na fase seguinte do processo apoptótico, as células fragmentadas dão origem a diversos corpos apoptóticos, que serão eliminados por meio de fagocitose (MAURO et al., 2011).

Entretanto, quando há falhas no mecanismo de eliminação das células lesionadas, consequentemente, surge uma exponencial quantidade de células com as respectivas lesões. Isso se deve, por exemplo, à interferência no ciclo celular e proliferação excessiva, características em evidência em diagnósticos de cânceres (BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2004; ARAÚJO et al., 2017).

Neste ensaio, as células apoptóticas são identificadas pelo padrão de análise de fragmentação do material genético, mediante a coloração com o alaranjado de acridina, de suspensões celulares provenientes do fígado e rins de cada animal do delineamento experimental de toxicogenética (Figura 23).

Para isso, o fígado e os rins são macerados individualmente e, após preparação de esfregaço, as lâminas seguem o protocolo de fixação em *Carnoy* por 5 minutos. Depois, estas são expostas a concentrações decrescentes de etanol nas proporções de 95% a 25%, e após isso, são lavadas com solução de Tampão *McIlvaine* por 5 minutos, submetidas à coloração com alaranjado de acridina (0,01%) por 5 minutos, e finalmente passam pela última lavagem em solução de Tampão *McIlvaine* (MAURO et al., 2011; ARAÚJO, et al., 2017).

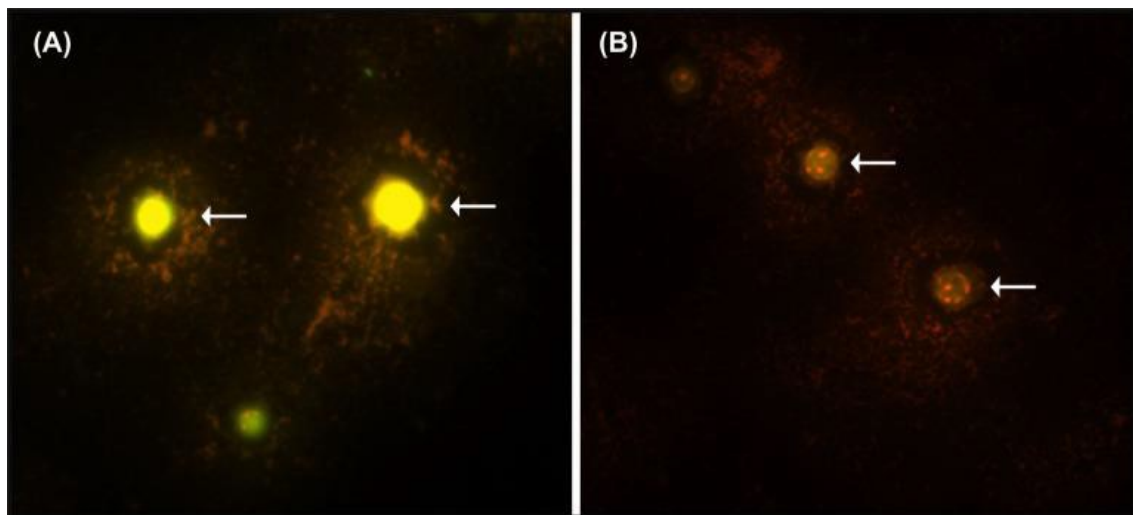


Figura 23. Ensaio de apoptose de células do fígado. A) Células normais. B) Células célula apoptóticas. Fonte: Adaptado: Carvalho et al. (2015).

2.7.6. Delineamento experimental da toxicogenética e imunomodulação

Para o delineamento são randomizados 50 animais em cinco grupos (três grupos recebem uma das doses do Inf-L-At, outros dois são grupos controles). Cada grupo recebe o n= 5 fêmeas e n= 5 machos, sendo esses

Grupo Controle Negativo: os animais recebem o veículo do Inf-L-At (uma mistura de solução hidroalcoólica 5% no volume de 1 mL/200g p.c., v.o.) e da ciclofosfamida (solução fisiológica no volume de 0,1 mL/10g p.c. i.p.), simultaneamente.

Grupo Controle Positivo: os animais recebem o veículo do Inf-L-At (solução hidroalcoólica 5% no volume de 1mL/200g p.c., v.o.) e a ciclofosfamida (50mg/kg p.c., i.p.) respectivamente.

Grupo Inf-L-At: os animais recebem o Inf-L-At no volume de (1mL/200g p.c., v.o.) em uma das três diferentes dosagens (62,5mg/kg; 125mg/kg; 250mg/kg p.c., v.o.). e o veículo da ciclofosfamida (solução fisiológica no volume de 0,1 mL/10g p.c. i.p), simultaneamente.

A coleta de micronúcleos no sangue periférico é estabelecida por punção da veia caudal em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com Inf-L-At (T1, T2 e T3, respectivamente). O ensaio para a contagem diferencial de células do sangue ocorre em T3. Após a realização dos ensaios descritos, os animais machos também são racionalizados, e utilizados nos ensaios para avaliação dos efeitos antihiperlicemiantes. Posteriormente, estes foram submetidos a anestesia por inalação de isoflurano e eutanásia por deslocamento cervical. Quanto aos órgãos, são realizadas as coletas do baço, fígado e rins para os estudos de fagocitose esplênica, apoptose, e avaliação macroscópica.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a potencial atividade anti-hiperglicemiante, efeitos de toxicidade aguda, genotoxicidade, mutagenicidade e imunomodulação do Infuso Liofilizado das folhas de *Aristolochia triangularis* (Inf-L-At) em ratos Wistar.

3.2. Específicos

3.2.1 – Análise de toxicidade

- Realizar o *screening* fitoquímico do Inf-L-At;
- Estimar a DL50 do Inf-L-At através da metodologia de toxicidade oral aguda “*Up and-Down*” *Procedure*;
- Investigar o potencial genotóxico do Inf-L-At *in vivo* pelo Teste Cometa;
- Avaliar o potencial mutagênico *in vitro* e *in vivo* do Inf-L-At através do Teste de Ames e Teste de Micronúcleo em sangue periférico e medula óssea em ratos Wistar;
- Avaliar o potencial citotóxico *in vivo* do Inf-L-At através do Teste de Micronúcleo em medula óssea em ratos Wistar;
- Determinar o potencial mutagênico do Inf-L-At após exposição aguda pelo Teste SMART;
- Caracterizar os efeitos imunomodulatórios do Inf-L-At através dos ensaios de fagocitose, contagem diferencial das células do sangue e apoptose.

3.2.2 – Análise do potencial antihiperglicemiante

- Investigar o potencial efeito hipoglicemiante do Inf-L-At *in vivo* pelo Teste oral de tolerância à glicose (TOTG);
- Avaliar a atividade das dissacaridases intestinais em ratos Wistar após a administração de diferentes doses de Inf-L-At;
- Determinar as concentrações de glicogênio hepático e muscular em ratos Wistar após administração de diferentes doses de Inf-L-At.

4. CONCLUSÕES

4.1. Geral

O Infuso Liofilizado das folhas de *A. triangularis* (Inf-L-At) não exibiu toxicidade aguda em ratos Wistar. No entanto, nas respectivas doses avaliadas, há potencial à mutagenicidade *in vivo*, descrita pelo teste Ames, teste de micronúcleo e teste SMART. Além disso, constatou-se também que o Inf-L-At possui efeitos hipoglicemiantes.

4.2. Específicas

- O Inf-L-At concentra altos teores de flavonoides;
- Comparando-se as fases Inf-L-At-Acetato e Inf-L-At-Butanólica, percebe-se que o Inf-L-At, consumido pela população em forma de chás, apresenta quantidades mínimas de ácidos aristolóquios, fato corroborado pelas análises químicas;
- De acordo com os resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda, não houve toxicidade sistêmica nos grupos experimentais testados. Na avaliação do screening hipocrático, os parâmetros analisados mantiveram-se ausentes, sugerindo ausência de toxicidade aguda durante o uso do Inf-L-At.
- O tratamento agudo do Inf-L-At demonstrou que as maiores concentrações são mutagênicas *in vitro*, com exponencial reversibilidade de linhagens TA100 (S+), além de diagnóstico positivo para indução de mutações nas concentrações de 2.5 e 5.0 mg/mL, similarmente a DXR. *In vivo*, demonstrou efeitos genotóxicos e mutagênicos em células do sangue e medula óssea. Neste contexto, as avaliações do screening toxicogenético, evidencia que o consumo do Inf-L-At oferece risco, frente ao exposto, causam danos no DNA de três modelos experimentais amplamente recomendados pelas agências regulatórias no mundo.
- Os ensaios de fagocitose esplênica e de apoptose no fígado e rins, corroboram os resultados do ensaio cometa, previamente, o organismo exposto ao Inf-L-At, ativam linfócitos, e os recrutam para o baço, com aumento na fagocitose das lesões identificadas. Após o primeiro ciclo celular (24-48h), cascatas de capazes são ativadas, e exponencialmente o Inf-L-At, potencializa as vias de apoptose, similarmente a CXP. Outros mecanismos podem ativar as respectivas vias, como inativação da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase, e pelo bloqueio causado em checkpoints G1/S e G2/M, concomitantemente na presença do dano no DNA, pela desregulação ou inativação de genes de reparo. Evidências preliminares indicam que estes efeitos imunomodulatórios, citotóxicos e mutagênicos possam estar correlacionados a presença de AAs, em espécies de *Aristolochia* spp.
- O Inf-L-At demonstrou efeito anti-hiperglicêmico com aumento no conteúdo do glicogênio hepático, apresentando efeitos similares aos propiciados pela Glibenclamida. No entanto, não houve alterações significativas no conteúdo do glicogênio muscular,

haja vista que, em comparação ao fármaco de referência com potencial antidiabético, os valores registrados foram inferiores. Sugere-se então que a redução nos picos glicêmicos causados após a administração do Inf-L-At não esteja relacionada somente ao aumento do glicogênio hepático, considerando que o Inf-L-At exibiu tendência à inibição na atividade das enzimas intestinais, em especial da maltase e lactase. Esta diminuição na absorção de dissacarídeos pelos enterócitos, pode ser uma possível via de manutenção do efeito anti-hiperglicêmico, pois manteve-se similar ao perfil de inibição observado em animais tratados com Glibenclamida. No entanto, outros estudos sobre os mecanismos de secreção de insulina são necessários. Ademais, pode-se correlacionar o efeito hipoglicemiante às altas concentrações de flavonoides no Inf-L-At.

- Recomenda-se que novos estudos com os constituintes identificados na composição química, das folhas de *A. triangularis* sejam explorados na forma isolada, para definição do mecanismo de ação, na hiperglicemia/diabetes, e possam corroborar as hipóteses construídas nesta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed Rio de Janeiro, Elsevier, 574p. 2008.

ABRAHAM, S. K.; GRAF, U. Protection by coffee against somatic genotoxicity in drosophila: Role of bioactivation capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 1996.

ADA (**American Diabetes Association**). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.

ADA (**American Diabetes Association**). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2007 Jan;30 Suppl 1: 42-7.

ADA (**American Diabetes Association**). Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v.34, supl.1, p. S62-S69, 2011.

ADA (**American Diabetes Association**). Standards of medical care in Diabetes-2016. The journal of clinical and applied research and education [Internet] 2016. Jan. [cited 2020 jan 15]. 39 (sup:1). Disponível em: <6-Standards-of-Care.pdf.> Acesso em: 15 jan de 2020.

ADA (**American Diabetes Association**). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl. 1): S13-S27 | <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>.

ADA (**American Diabetes Association**). Standards of Medical Care in Diabetes – 2019. *Diabetes Care*.

Disponível em: http://care.diabetesjournals.org/content/diacare/suppl/2018/12/17/42.Supplement_1.DC1/DC_42_S1_Combined_FINAL.pdf. Acesso em 20 dezembro de 2019.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, n. 13, p. 13-19, 1993.

AMAT, A. G. *et al.* Evaluation of cytological parameters induced by aqueousextracts of seven plants used as antihypertensive agents in Argentine folk medicine. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 37-42, 2002.

AMES, B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection* (Hollaender A, ed). **New York: Plenum Press**, v. 1, p. 267–282, 1971.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 782–786, 1973.

ANANTHI, R.; CHANDRA, N.; SANTHIYA, S. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 558–560, 2010.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. Diário Oficial União. 24 abr 2000.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. Diário Oficial União. 2004.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. **Resolução RDC 14 DE 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2010.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2ª versão. Brasília, 2013.^a

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos eo registro ea notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial União, 2014.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitaria**. Consolidado de normas da COFID. Versão V. 2015.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitaria**. Estudos Não Clínicos Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos Fitoterápicos E Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Guia Nº 22/2019 – Versão 1. Brasília, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2977552/Guia+22+.pdf/8bec9e94-a3e2-4bb9-9e50-0f79cc876a8c>. Acesso em: 26 jan. 2020.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitaria**. [Online]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

ARALDI, R. P. *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.

ARAÚJO, C. F. Morfodiagnose macroscópica, comparação anatômica, histoquímica e fitoquímica de *Aristolochia labiata* Willd, *Aristolochia odoratissima* L Sp e *Aristolochia silvatica* Barb.Rodr.: espécies medicinais da Amazônia meridional. / **Dissertação de Mestrado** — Alta Floresta – MT, 2017.

ARAÚJO, F. H. S. *et al.* In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, p. 665-675, 2017.

BAPTISTA M.M., *et al.* Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil. **Baptista et al. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v.9, n.54, p.1-16, 2013.

BARBISAN, L. F. *et al.* Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. **Genetics and Molecular Research**, p. 295-308, 2003.

- BATI, K.; KWAPE, T.E.; CHATURVEDI, P. Anti-Diabetic Effects of an Ethanol Extract of *Cassia abbreviata* Stem Bark on Diabetic Rats and Possible Mechanism of Its Action:-Anti-diabetic Properties of *Cassia abbreviata*. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 20, n. 1, p. 45, 2017.
- BATTISTI C., *et al.* Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, 2013.
- BEARDSALL, K *et al* Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 13, p. 543-548, 2003.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. **Dieta, nutrição e câncer. São Paulo: Atheneu**, p. 79-87, 2004.
- BENNETT C. M; GUO M; DHARMAGE S. C. HbA1c as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetic Medicine**. 24:333–43; 2007.
- BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S.; GUERRA, M. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, p. 219-227, 2009.
- BOAS, G. R. V. *et al.* Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. **Food & function**, v. 9, n. 7, p. 3707-3717, 2018.
- BOLSON M., *et al.* Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.161, p.1-10, 2015.
- BOSI, P.L *et al.* Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 6, p. 726-732, 2009.
- BRAHMACHARI, G. **Discovery and development of antidiabetic agents from natural products**. In: Natural Product Drug Discovery. Elsevier, 2016. 332 p.
- BRAIT, D. R. H. *et al.* Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 699-705, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus. **Caderno de atenção básica**, n. 36, 2013
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Medicamentos Específicos, Notificados, Fitoterápicos, Dinamizados e Gases Medicinais. **Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos**. Brasília, 2018.

- CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, n.1, p.373-382, 2016.
- CAPELLARI Jr., L. Aristolochiaceae. In: J.A. Rizzo (ed.) **Flora dos Estados de Goiás e Tocantins**. Coleção Rizzo. Goiânia, Universidade Federal de Goiás, v. 27, pp. 1-34. 2001.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivo brasileiro de endocrinologia metabólica.**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.
- CARVALHO, P. C. *et al.* Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 715-721, 11, 2015.
- CASELLI C. B., SETZ E. Z. F. Feeding ecology and activity pattern of black-fronted titi monkeys (*Callicebus nigrifrons*) in a semideciduous tropical forest of southern Brazil. **Primates**. v.52, p.351-359, 2011.
- CHAN K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v. 52, n. 9, p. 1361-1371, 2003.
- CHUNG, Y. M. *et al.* A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1792-1794, 2011.
- COLLINS, A. *et al.* The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. Mutation Research - Reviews in **Mutation Research**, v. 759, n. 1, p. 27- 39, 2014.
- COLLINS, A. R. The comet assay: A heavenly method! **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 1- 4, 2015.
- CORRÊA, C; BIASI, L. Área foliar e tipo de substrato na propagação por estaquia de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham. Et Schl.). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 3, 2003.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I. *et al.* Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012,
- CRETON, S. *et al.* Acute toxicity testing of chemicals – Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 50-83, 2010.
- CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- DA CONCEIÇÃO, R. A.; DA SILVA, P. N.; BARBOSA, M. L. C. Fármacos para o tratamento do Diabetes tipo II: uma visita ao passado e um olhar para o futuro. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 514-534, Mar.-Abr. 2017.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. 1. ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

DA SILVA, T.; LOPES, L. M. X. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 929-937, 2006.

DA SILVA TEIXEIRA, J. P., *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por plantas medicinais no Brasil de 2012 a 2016. **Brazilian Journal of Development**, 6(10), 82199-82209. 2020.

DE ALVARENGA, C. F, *et al.* Uso de plantas medicinais para o tratamento do Diabetes Mellitus No Vale Do Paraíba-SP. **Revista Ciência e Saúde On-line**, v. 2, n. 2, 2017.

DE CARVALHO, L. M.; DA COSTA, J. A. M.; CARNELOSSI, M. A. G. Qualidade em plantas medicinais. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**, 2010.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 591, n. 1-2, p. 8-15, 12/11/ 2005.

DE LIMA, F. F. *et al.* Study on the cytotoxic, genotoxic and clastogenic potential of *Attalea phalerata* Mart. Ex Spreng. Oil pulp in vitro and in vivo experimental models. **PLoS One** 11, 1-11. 2016.

DE OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imune-inflamatória modulada por ácidos graxos insaturados. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 113-124, 2013.

DE VASCONCELOS, T. B. *et al.* Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

DELVES P.J.; ROITT D. **The Immune System** - First of two parts. *N Engl J Med*. 343:37-50, 2000.

DHOUIOUI, M. *et al.* Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. paucinervis Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 301-306, 2016.

ESCOTT, G. M. **Vias de sinalização envolvidas na regulação hormonal do metabolismo de células de Sertoli humanas e de ratos: papel da insulina, do IGF-1 e do FSH**. 74f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, 2016.

FERRARI, F. *et al.* Biochemical and Molecular Mechanisms of Glucose Uptake Stimulated by Physical Exercise in Insulin Resistance State: Role of Inflammation. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 113, n. 6, p. 1139-1148, 2019.

FERRER J.C. *et al.* Control of glycogen deposition. **FEBS Lett**. 546:127-32;2003

FOLADOR, P. *et al.* Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. *Fitoterapia*. 81, 1180–1187; 2010.

FDA (Food and Drug Administration) Guidance for industry impurities in drug substances and products: Recommended approaches. **Pharmacology and Toxicology**, n. December, p. 1–16, 2008.

FRAGIORGE, E. J. *et al.* Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 393–401, 2008.

FRANCA, V. C. *et al.* Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 326-330, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2005000400012&lng=en&nrm=iso. Acesso em 21 de janeiro de 2020.

FRANÇA I. S. X. D. *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 201–208, 2007.

FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. de; CAPPELARI JUNIOR, L. Classification of *Aristolochia* species based on GC–MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 168-175, 2008.

FRANCISCO, L. F. V. *et al.* Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity of Aluminum, Manganese and Lead in Meristematic Cells of Root *Allium cepa*. **Orbital: The Electronic Journal Of Chemistry**, v. 10, p. 60-65, 2018

FREITAS, S. H. *et al.* Aspectos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais do baço de ratos após o clampeamento total do pedículo hepático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, 1314-1321, 2009.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISSLER, E. N. The kit ligand, stem cell factor. **Advances in immunology**, v. 55, p. 1-96, 1993.

GENUTH, S. Type 1 *diabetes mellitus*. **ACP Medicine**, p. 1-19, 2008.

GHOSH, R. *et al.* Hypoglycemic activity of *Ficus hispida* (bark) in normal and diabetic albino rats. **Indian Journal of pharmacology**, 36 (4), 222; 2004.

GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of Model Hosts and Man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as Model Hosts for Infectious Disease Research. E. Mylonakis *et al.* (eds.), Recent Advances on Model Hosts, **Advances in Experimental Medicine and Biology** 710, 2012.

GOIS, M. A. F. *et al.* Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Rev. bras. plantas med.** Botucatu, v. 18, n. 2, p. 547-557, junho de 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000200547&lng=en&nrm=iso>. acesso em 21 de janeiro de 2020. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_170.

GOLLAPUDI, B.; KAMRA, O. Application of a simple giemsa-staining method in the micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 64, p. 45–46, 1979

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental**, p. 173-200, 2003.

GONZÁLEZ, F.; STEVENSON, D. W. A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 26, p. 25-60, 2002.

GORRIL, L. E. *et al.* Risco das plantas medicinais na gestação: uma revisão dos dados de acesso livre em língua portuguesa. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 1, 2016.

GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, v. 51, n. 2, p. 168–173, 1995.

GRAF, U. *et al.* Somatic Mutation And Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis** V.6 p.347-377, 1984

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 59–67, 1992.

GRIFFITHS, A. J.F. *et al.* **Introdução a Genética**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.780. 2016.

GUZMÁN-RINCON, J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. **Plenum**, New York, p. 169-181. 1995.

HARBONE, J. B.; BEXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2a ed. LONDON: Taylor and Francis, 1999.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, n.1, p. 45-51, 2003.

HARVEY, A.L. *et al.* What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicol**, v.36, n.11, p. 1635-40, 1998.

HARVEY A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294–300, 2000.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245–249, 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research Letters**, v. 120, n. 4, p. 241–247, 1983

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HEINRICH, M. *et al.* Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 108–144, 2009.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico Biological Interactions**, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.

HOEHNE, F. C (1927) Monografia ilustrada das Aristolochiaceas brasileiras. Memórias do Instituto **Oswaldo Cruz** 20: 67-175.

HOEHNE, F. C. Flora brasílica: Aristolochiaceae. São Paulo: **Instituto de Botânica de São Paulo**, 1942. v. 15, pt. 2.

HOFFMANN, J. The immune response of *Drosophila*. **Nature** 426:33–38 32. 2003.

HOLLAND, S. M.; VIZI, E. S. **Immunomodulation**. Current Opinion in Pharmacology, v. 2, p.425- 427, 2002.

HOLZBACH, J. C. Investigação da composição química de espécies de *Aristolochia* do Cerrado: estudo dos caules de *Aristolochia urupaensis* e de flores de *Aristolochia trulliformis*. Tese de Doutorado. **UNESP** 2018.

HUBER, H. Aristolochiaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. The families and genera of vascular plants. **Berlin: Springer**, 1993. v. 2, p. 129- 137.

HUK, A. *et al.* Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 85–88, 2015.

IDF (**International Diabetes Federation Diabetes**) Atlas: Eighth edition. 2017. Disponível em: < <https://diabetesatlas.org/en/>> Acesso em: 03 jan 2020.

ISHII, P.L. *et al.* Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 412-422, 4// 2011.

JADOT I. *et al.* An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. **International Journal Molecular Science**. v.18, n. 297, p.1-24, 2017.

JAMES *et al.* - the expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 26, supl. 1, p. S5-S20, 2003.

JESUS, N. A.; SUCHARA, E. A. Cultivo de plantas tóxicas e a ocorrência de intoxicações em domicílios no município de Barra do Graças. **Revista Eletrônica da UNIVAR**, v.2; n.10, p.89-95, 2013.

JUNIOR, M. M. *et al.* Principais mecanismos de ação do sistema imunológico e sua resposta relacionada a neurodegeneração de células do sistema nervoso central e periférico em situações de infecção viral. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 2, p. 129-144, 2020.

KAPPEL, V. D. Estudo da atividade biológica de *Baccharis articulata*, Musa x paradisiaca e rutina na homeostasia da glicose em modelos experimentais in vivo e in vitro. Tese de doutorado UFSC. 2012.

KAPPEL, *et al.* Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. **Molecules** V.17, pp. 6754-6768, 2012.

KAPPEL, V. D. *et al.* Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 1179-1186, 2013.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular**. 3º edição. Editora Saunders, 2012.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research - Fundamental and Molecular **Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 155-166, 2000.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal. Biochem.**1962, 4, 17-23.

KRUSZEWSKI, M. *et al.* Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. **Mutagenesis**, v. 27, n. 5, p. 551-558, 2012.

KUJAWSKA, M.; HILGERT, N.I.; Phytotherapy of Polish migrants in Misiones, Argentina: Legacy and acquired plant species. **Journal of Ethnopharmacology**. v.153, p.810-830, 2014.

KUMAR, V. *et al.* Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 565-583, 2003.

KUMAR, V. *et al.* CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. **Chemosphere**, v. 81, n. 4, p. 464-468, 2010.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LALLI, C. A; TSUKUMO, D. M. L. Conceito, Diagnóstico, Classificação e Complicações Crônicas do Diabete Melito. In: LIMA, M. H. M; ARAÚJO, E. P, organizadores. **Paciente Diabético: cuidados de enfermagem**. Rio de Janeiro: MedBook; 2012. p. 3-22.

LANGIE, S. A. S. *et al.* Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: A comet-based in vitro repair assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 461-471, 2011.7

- LEITÃO, G. G. *et al.* Essential oils from Brazilian *Aristolochia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 6, p. 403-408, Nov./Dec. 1991.
- LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 65-75, 1992.
- LEITE, C. A. V. G.; CALLADO, R. B.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130-142, 2012.
- LEMAITRE, B. The road to toll. **Nat Rev Immunol** 4:521-527 33. 2004.
- LEME, J. A. C. *A et al.* Effects in short-term of Alloxan application to diabetes induction in wistar rats. **Bioscience Journal**, 2010.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, p. 216-226, 2008.
- LEÓN-DÍAZ, R. *et al.* Antitubercular Activity and the Subacute Toxicity of (-)- Licarin A in BALB/c Mice: A Neolignan Isolated from *Aristolochia taliscana*. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 2, p. 99-104, 2013.
- LI, C.; WANG, Y. A New Record of *Asarum* (Aristolochiaceae) in Shaanxi and Its Karyotype. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, v. 2014, n. 27, p. 6, 2014.
- LIN, W. *et al.* Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (I). **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 8-13, Jan. 1997.
- LOPES, L. M. X. *et al.* Terpenes from *Aristolochia triangularis*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 660-662, 1990.
- LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: MOHAN, R. M. (Ed.). **Research Advances in Phytochemistry**. Kerala: Global Research Network, 2001. v. 2, p. 19-108. 2009.
- MACHADO, K. E. *et al.* Apoptotic Events Induced by Maleimides on Human Acute Leukemia Cell Lines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1904-1916, 2013.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.
- MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. **Neuron**, v. 86, n. 4, p. 883-901, 2015.
- MAKARE, N. *et al.* Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 133-137, 2001.
- MARINHO, R. *et al.* Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 12, n. 1, p. 82-89, 2014.

MARLES, R.; FARNSWORTH, N. Antidiabetic plants and their active constituents1. **Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 137-165, Out. 1995.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173 – 215, 1983.

MARON D. M; KATZENELLENBOGEN J.; AMES B. N. Compatibility of Organic Solvents With The *Salmonella*/Microsome Test. **Mutation Research**. v.88, p.343- 350, 1981.

MARQUES R. C. P. *et al.* Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 536, n. 1–2, p. 117–120, 2003.

MAURO, M. O. *et al.* Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 715, n. 1–2, p. 7-12, 10/1/ 2011.

MAYADAS, T. N. *et al.* The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual review of pathology**, v. 9, 181-218, 2014.

MAZZEO, C. *et al.* Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, 1603-1613, 2015.

MEDZHITOV R.; JANEWAY C. J. **Innate immunity**. *N Engl J Med*. 343:338-44, 2000.

MELO, C. R *et al.* O uso de plantas medicinais para doenças parasitárias. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 28-32, 2017.

MELO, J. G. *et al.* Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, 2011.

MENDANHA D. M. *et al.* Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Res**, 9, 1, 69-77, 2010.

MENDONÇA, L. A. B. M. *et al.* Toxicity and phytochemistry of eight species used in the traditional medicine of sul-mato-grossense, Brazil . **Brazilian Journal of Biology**, 80(3), 574-581.2020.

MEZZALIRA, B.; FUNCHAL, C.; DANI, C. Ensaio cometa: avaliação da atividade do calcogênio. **Ciência em Movimento**, n. 33, p.47-55, 2014.

MICHL, J. *et al.* Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. **Natural Products Report**, v. 31, n. 5, p. 676-93, 2014.

MICHL. J. *et al.* LC-MS- and 1H NMR-based metabolomic analysis and in vitro toxicological assessment of 43 *Aristolochia* species. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 30-37, 2016.

MILICHOVSKÝ J. *et al.* Active Site Mutations as a Suitable Tool Contributing to Explain a Mechanism of Aristolochic Acid I Nitroreduction by Cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. **International Journal Molecular Science**. v.17, n.213, p.1-16, 2016.

MONTANARI, T. O uso popular de plantas como emenagogas e abortivas. **Reprod Clim**, v. 23, n. 4, p. 170-175, 2008.

MOORE, M. C.; CHERRINGTON, A.D.; WASSERMAN, D. H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, p. 343-364, 2003.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29 – 60, 2000.

MOTA, K. S. de L. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979–1012, 2009.

MOUKETTE, B. M. *et al.* Antioxidant and Synergistic Antidiabetic Activities of a Three-Plant Preparation Used in Cameroon Folk Medicine. **International Scholarly Research Notices**, v. 2017.

MUHAMMAD H. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 647–653, 2011.

MÜLLER, T. D. *et al.* The new biology and pharmacology of glucagon. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 2, p. 721-766, 2017.

MUNARI C.C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 22–28, 2010.

MUSCHIETTI. L. *et al.* The anti-inflammatory effect of some species from South America. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 84-86, Feb. 1996.

NASCIMENTO, D. S; CERVI, A. C; GUIMARÃES, O. A. The family Aristolochiaceae Juss. in Paraná state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 414-422, 2010.

NATARAJAN, A. T. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. SUPPL. 3, p. 225–229, 1993.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NITZSCHE, D.; MELZIG, M. F.; ARLT, V. M. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I – A component of Aristolochiaceae plant extracts used in homeopathy. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 325–334, Mar. 2013.

NOGUEIRA, C. R. Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso: compostos nitrados. Dissertação de Mestrado, UNESP, Araraquara, 2010.

NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. X. Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 780-782, 2012.

NOROOZI, M. *et al.* Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 1210–1218, 1998.

OECD. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. No 401: Acute Oral Toxicity.** Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 1987. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-401-acute-oral-toxicity_9789264040113-en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03>

OECD. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. No 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure.** Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en> Acesso em 18 fevereiro de 2019.

OECD. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. No 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method.** Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001b. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en> Acesso em 18 fevereiro de 2019.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure.** Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2008a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03> Acesso em 18 fevereiro de 2019.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents.** Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2008b.

OECD. **OECD Guideline for the testing of chemicals. No 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.** Paris, 2016a.

OECD. **OECD Guideline for the testing of chemicals. No 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test** Paris, 2016b.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

OHI-TOMA, T. *et al.* Molecular Phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. **Systematic Botany**, v. 31, n. 3, p. 481-492, 2006.

OLIVEIRA, D. G. *et al.* Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 165-169, Dec. 2007.

OSHIRO, M. C. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology)–Visa em Debate**, v. 4, n. 4, p. 116-122, 2016.

PACHECO, A. G. et al. ¹³C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14, p. 1245-1262, 2009.

PEDROSO, T. F. M. Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation, and anticholinesterase effects in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1383-1392, Mar. 2019.

PEREIRA, A. O. et al. Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 461-467, Oct. 2018.

PORTAL FIOCRUZ. **No Dia Mundial da Saúde 2016, OMS lança seu primeiro relatório global sobre Diabetes**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/nodia-mundial-da-saude-2016-oms-lanca-seu-primeiro-relatorio-global-sobrediabetes>>. Acessado: 13, Fev. 2019.

PRIESTAP, H. A. et al. Investigation of the essential oils from *Aristolochia triangularis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, n. 3, p. 95-98, May/June 1990.

PURCHASE, I. F. et al. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicological Sciences*. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

QUEIROGA, G. M. T. Plantas medicinais e fitoterápicos como alternativa terapêutica às infecções urinárias: um diagnóstico dessa realidade na saúde pública de Mossoró. Dissertação de Mestrado, **UFERSA** 2015.

QUEIROZ F. M. D. et al. Evaluation of (anti) genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow using the micronucleus test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, n.1, p.135-148, 2013.

RASOULI, H. et al. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. **Food & Function**, 2017.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RAYNOR, D. K.; DICKINSON, R.; KNAPP, P.; LONG, A. F.; NICOLSON, D. J. Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? *BMC Medicine*, v. 9, n. 1, p. 94, 2011.

REGNER, G.G. et al. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 242–249, 2011.

REIS, P.R.M. *et al.* Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 169–174, 2011.

REZATOFIGHI, S. H.; SOLTANIAN-ZADEH, H. Automatic recognition of five types of white blood cells in peripheral blood. **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v. 35, n. 4, p. 333-343, 2011.

RIBEIRO, L. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo**. In: RIBEIRO, L.; FÁVERO, D. (Eds.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173–200. 2003.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Current Molecular Medicine**, v. 02, p. 101–120, 2002.

ROCHA, E. O. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Gabirola). (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-graduação do **Instituto de Química**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. 2011.

ROSELINO, M. N. *et al.* A potential synbiotic product improves the lipid profile of diabetic rats. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 114, 2012.

ROVOZZO, G. C; BURKE, C. N. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, p. 159, 1973.

RÜCKER, G. *et al.* 3,4-Dimethoxy-3,4-demethylenedioxy-cubebin, a new lignan from *Aristolochia triangularis*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 5, p. 457-458, 1978.

RÜCKER, G. *et al.* Constituents of *Aristolochia triangularis*. **Planta Medica**, v. 41, n. 2, p. 143-149, Feb. 1981.

SAKS, M. *et al.* Genotoxicity: Mechanisms, **Testing Guidelines and Methods**. Global journal of Pharmacy & pharmaceutical Science, v. 1, n. 5, p. 1–6, 2017.

SALLES, B. C. C. *et al.* SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA INSULINA EM VIAS ANABÓLICAS. **Revista Farmácia Generalista/Generalist Pharmacy Journal**, v. 1, n. 2, p. 25-45, 2019.

SBD (**Sociedade Brasileira De Diabetes**). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Diabetes; 2016. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>

SBD (**Sociedade Brasileira De Diabetes**). **Tipos de diabetes**. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/tipos-de-diabetes>>. Acessado: 13, Fev., 2019 .a

SBD (**Sociedade Brasileira De Diabetes**). Posicionamento Oficial SBD nº 01/2019. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2: Algoritmo SBD; 2019 b.

SCHMEISER H. H., *et al.* Exceptionally long-term persistence of DNA adducts formed by carcinogenic aristolochic acid I in renal tissue from patients with aristolochic acid nephropathy. **International Journal of Cancer**. v.135, p.502–507, 2014.

SCHVARTZMAN, J. B. *et al.* Cytological effects of some medicinal plants used in the control of fertility. **Experientia**, v. 33, n. 5, p. 663-665, May 1977.

SHAH, P. *et al.* Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. **The American journal of physiology**. 1999;277(2 Pt 1):E283-90.

SHIN, I. S. *et al.* Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 696–703, 2011.

SIEGEL, D. J. **The developing mind: Toward a neurobiology of interpersonal experience**. Guilford Press, 1999.

SILVA, S. R. *et al.* **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Quito, Equador: TRAFFIC América do Sul, 2001.

SILVA, J. D. A. *et al.* Toxicological properties of an aqueous extract of *Aristolochia triangularis* leaves, using the brine shrimp lethality and *Allium cepa* bioassays. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 8, e20190091, 2019.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782019000800753&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 de Janeiro de 2020.

SILVA, G. A.; SOUZA, C. L.; OLIVEIRA, M. V. Teste oral de tolerância à glicose: solicitações desnecessárias e condições adequadas a realização do teste. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 56, 2020

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442020000100401&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 04 de Março de 2021.

SILVEIRA, P. F. *et al.* Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: Uma realidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 618–626, 2008.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 3// 1988. ISSN 0014-4827.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2020.

SINITOX- **Sistema Nacional De Informações Tóxico-Farmacológicas** - Dados de Intoxicação – Dados Nacionais – Fiocruz – Brasil, 2014. Disponível em <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>. Acesso em 24 de fevereiro de 2021.

SINITOX- **Sistema Nacional De Informações Tóxico-Farmacológicas** - Dados de Intoxicação – Dados Nacionais. Fiocruz – Brasil, 2016. Disponível em <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>. Acesso em 24 de fevereiro de 2021.

SORIA, N.; RAMOS, P. Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**. v.13, n.2, p.8-17, 2015.

SOUSA, A.; SANTOS, A.; ROCHA, R. PLANTAS MEDICINAIS EM ENFERMAGEM: OS SABERES POPULARES E O CONHECIMENTO CIENTÍFICO. **REVISTA ELETRÔNICA EXTENSÃO EM DEBATE**, v. 6, n. 1, p. 48-67, 2019.

SOUZA, P. M. *et al.* PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, p. 126985, 2020.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: um guia para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2005.

SPIVAK, G. *et al.*, New applications of the Comet assay: Comet– FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**, v. 681, p. 44–50, 2009

SPIVAK, G. New developments in comet-FISH. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 5–9, 2015.

SPONCHIADO, G. *et al.* Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 289- 296, 2016.

STANDEN, N.B. Properties of cloned KATP channels mimic those of β -cells. **J Physiol**. 498:1; 1997.

STIBOROVÁ M. *et al.* Enzymes Metabolizing Aristolochic Acid and their Contribution to the Development of Aristolochic Acid Nephropathy and Urothelial Cancer. **Current Drug Metabolism**. v. 14, n. 6, p. 695-705, 2013.

TAMURA, A. *et al.* Accelerated apoptosis of peripheral blood monocytes in *Cebpb*-deficient mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 2, 654-658, 2015.

TEMPONE, A. G. *et al.* Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 443- 449, 2008.

TIAN, H. *et al.* DNA damage response – A double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 358, n. 1, p. 8-16, 3/1/ 2015.

TICE, R. R. *et al.* The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. **Mutation Research**. v. 35, p. 206-221, 2000.

TIZARD, I.; NI, Y. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 1, p. 54-60, 1998.

TOLOUEI, S. E. L. *et al.* Cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluation of *Alibertia edulis* (rich.) a. Rich. ex DC: an indigenous species from Brazil. **Drug And Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1-8, 2018.

TRAESEL, G. K. *et al.* Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food Chemical and Toxicology**, v.74, p.320-325, 2014.

TRAESEL, G.K. *et al.* Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. **J. Med. Food** 0, 1–8. 2017.

TROJAN-RODRIGUES, M. *et al.* Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p.155-163, Jan. 2012.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.

VALADARES, B.L.B. (Org.). **Teste de mutações e recombinações somáticas (SMART)**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2000.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era Do Teste DL50” **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 3, n.2, p. 93-98, 2006.

VASCONCELOS, J. *et al.* Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v.7, n.1, p.1-10, 2009

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA, Série Botânica**. Porto Alegre, v.61, n.1-2, p.83-103, 2006.

VIANA, P.L. *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5SPE, p. 1107-1124, 2016.

VIBRANS, A. C. *et al.* **Levantamento Socioambiental (LSA): Cipó-mil-homens (Aristolochia triangularis) – Mitos e verdades**. In: Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina (IFFSC).

Disponível em:

<<https://sites.google.com/view/iffportal/publica%C3%A7%C3%B5es/cartilhas>>. Acesso em Agosto de 2019.

VOGEL, E. W. *et al.* The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. **IARC scientific publications**, v. 146, p. 427–470, 1998.

WANG, H. *et al.* Control of lymphocyte homeostasis and effector function by the aryl hydrocarbon receptor. **International Immunopharmacology**, v.28, 2, 2015

WANKE, S.; GONZÁLEZ, F.; NEINHUIS, C. Systematics of Pipevines: combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 167, n. 6, p. 1215-1227, 2006.

WATANABE, K.; KAJITA, T.; MURATA, J. Chloroplast DNA variation and geographical structure of the *Aristolochia kaempferi* group (Aristolochiaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 3, p. 442-453, 2006.

WHO (World Health Organization). et al. 1998. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: World Health Organization, 1998.

WHO (World Health Organization). 2004. Aristolochic acid. **WHO Pharmaceuticals Newsletter**, v. 5, 2004. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js8114e/1.2.html>>. Acessado: 13, Fev., 2019.

WHO (World Health Organization). Global Report on Diabetes. 2016. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257eng.df>> Acesso em: 03 jan 2020.

WU, T. S. *et al.* Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 594-624, 2004.

YU, J. *et al.* Analysis of aristolochic acids, aristololactams and their analogues using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Natural Medicine**, v. 14, n. 8, p. 626-40, 2016.

YUN, H. *et al.* Antimutagenic effects of genistein in drosophila somatic mutation assaying system. **Journal of Korean Association of Cancer Prevention**, v. 5, n. 3, p. 135–143, 2000.

ZINGA C.V. *et al.* Agression rénale aiguë après un traitement à base de *Quassia africana* baill: à propos d'une série decas. **Abstracts/Néphrologie & Thérapeutique**. v.12, p.333–382, 2016.

ZON, L. I. Developmental biology of hematopoiesis. **Blood**, v. 86, n. 8, p. 2876-2891, 1995.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

6. APÊNDICES

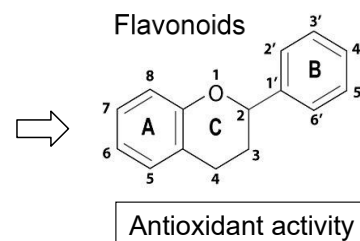
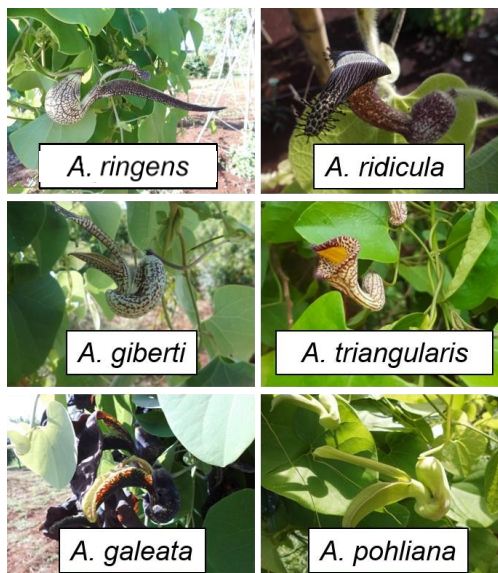
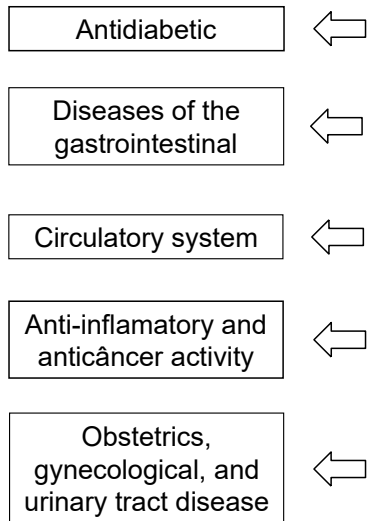
6.1. Artigo I: Phytochemical, pharmacological, and toxicological characteristics of the genus *Aristolochia* (s.l) and the species *A. triangularis*

Submetido em Fitoterapia. Fator de Impacto 2,882. Qualis B1 em Medicina II.

Data da Submissão: 18/07/2021.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/fitoterapia/0367-326X/guide-for-authors>

Pharmacological and therapeutic effects



Phytochemical, pharmacological, and toxicological characteristics of the genus *Aristolochia* (s.l) and the species *A. triangularis*

Flávio Henrique Souza de Araújo ^{a*}, Larissa Pires Mueller ^a, Mi Ye Marcaida Olimpio ^a, Virginia Demarchi Kappel Trichez ^a, Cláudio Rodrigo Nogueira ^b, Silvia Aparecida Oesterreich ^a.

^a Toxicological Testing Laboratory. Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Mailbox 364, Zip Code 79804-970, Dourados-MS, Phone +55 (67) 3410-2001. E-mail: flaviobiosmart@gmail.com*; laripiresmueller@gmail.com; miye_olimpio@hotmail.com ; virginiakappel@ufgd.edu.br; silviaoesterreich@gmail.com.

^b Department of Chemistry, Federal University of Grande Dourados, Faculty of Exact Sciences and Technology, Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Mailbox 364, Zip Code 79804-970, Dourados-MS, Phone +55 (67) 3410-2001. E-mail: claudiornogueira@ufgd.edu.br

*** Corresponding author.**

Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados. Rodovia Dourados – Itahum, Km 12. Mato Grosso do Sul, Brazil. Tel number : +55-67-3410-2001, E-mail addresses flaviobiosmart@gmail.com.

Authors' contributions

Flávio Henrique Souza de Araújo, Cláudio Rodrigo Nogueira, Silvia Aparecida Oesterreich: Responsible for conducting and developing the research, methodology, data processing and discussion.

Larissa Pires Mueller, Mi Ye Marcaida Olimpio, Virginia Demarchi Kappel Trichez: Responsible for data analysis, review.

All authors contributed to the writing and review of the article.

¹Abbreviations

¹Abbreviations: AA: Aristolochic Acids; AL: aristolactams; ANVISA: National Health Surveillance Agency; DNAs: Deoxyribonucleic acid; g: Gram; LC-MS: Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry; mL: Milliliter; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; RDC: Resolution of the Collegiate Board; s.l: sensu lato; SVS/MS: Health Surveillance Secretariat of the Ministry of Health; w/v: weight/volume.

Abstract

The practice of using medicinal plants has been established in societies since ancient times. However, the use without scientific proof can cause adverse effects related to its toxicity. In this context, the species *Aristolochia spp.* are plants of the Brazilian flora widely used in popular medicine. In this perspective, the study aims to demonstrate, through a literature review, the phytochemical, pharmacological, and toxicological potential of *genus Aristolochia (s.l.) and the species A. triangularis*. A literature review was conducted between February 2019 and March 2020 in the Medline, Pubmed, Lilacs, and Scielo databases. Articles published in English and Portuguese between the years 1968 to 2020, as well as monographs, dissertations, and theses were selected for the analyses. It was found that *Aristolochia triangularis* has different medicinal properties related to its biological and chemical composition and exhibits considerable nutritional, medicinal, cultural, and economic value. Although it is widely used in folk medicine, it is evident that there is a lack of research to inform the biological effects described by empirical use and to ensure its use.

Keywords: Medicinal plants, Aristolochiaceae, Cipó-de-mil-homens, Phytochemistry, Toxicology.

1. Introduction

Although centuries of traditional use of medicinal plants by different populations suggests safety regarding their use, unlike allopathic medicines, the toxicity of plants and even traditional herbal medicines have not been evaluated as indicated by drug regulatory agencies, a factor that may pose a risk to human health [1]. Nevertheless, despite this unknown toxic potential of many plant species, medicinal plants are often employed in the control and treatment of various chronic diseases, consumed mainly as teas and infusions [2].

Trojan-Rodrigues and collaborators [2] published a compilation of 81 plant species, distributed in 42 angiosperm families, that have been commonly used as antidiabetics in folk medicine in the state of Rio Grande do Sul, Brazil [2, 3].

Among the families listed by Brazilian authors was Aristolochiaceae, consisting of four genera and approximately 600 species distributed predominantly in tropical, subtropical, and temperate regions of the planet [4, 5]. Aristolochiaceae, especially those in the genera *Aristolochia* and *Asarum*, are widely used in traditional medicine [6, 7]. Regarding the applications of *Aristolochia* spp. it is possible to list: i) the treatment of cancer, ii) gastrointestinal complications, iii) snake poisoning and bites, iv) treatment of malaria and intestinal worms, and v) treating gynecological, dermatological, cardiovascular, and central nervous system conditions [8].

Accordingly, *Aristolochia triangularis* Cham. (Aristolochiaceae), popularly known as "cipózinho-prá-diabetes" and commonly found in Brazil, is one of 92 *Aristolochia* spp. so far cataloged. It has a considerable history of popular use for the treatment of diabetes, rheumatism, infections, skin diseases, and wounds [9]. In this context, the lack of studies on medicinal plants, especially on the species *A. triangularis*, suggests the urgency of developing new research, aiming to investigate the pharmacological potential and toxicity of this species.

2. Methodology

Despite the fact that *A. triangularis* is one of the most cited Brazilian species from an ethnopharmacological point of view, 49 articles selected in this review occurred through searches in the main databases: 1) Medline (Online System for Search and Analysis of Medical Literature); 2) Pubmed (Public Medline or Publisher Medline); 3) Lilacs (Latin American and Caribbean Literature on Health Sciences); 4) Scielo (Scientific Electronic Library Online). However, there are still gaps of important knowledge to be filled in, as most studies cover chemical characterization reports and preliminarily address the biological activities and effects of this plant. This fact reinforces the need for the compilation to understand the true medicinal value of this plant species. The literature review was conducted between February 2019 and March 2020. The descriptors used to select the studies were: *Aristolochia triangularis*; *Aristolochia triangularis*/toxicity; *Aristolochia triangularis*/safety; *Aristolochia triangularis*/pharmacological effects; *Aristolochia triangularis*/genotoxicity; *Aristolochia triangularis*/chemical analysis; genus *Aristolochia*; Flavonoids; toxicology; pharmacology of medicinal plants; family Aristolochiaceae/phytoconstituents; primary metabolites, secondary metabolites; phenolic compounds; medicinal plants; plant poisoning. Articles published in English and Portuguese between the years 1968 to 2020, as well as monographs, dissertations, and theses were selected for analysis. The articles that met the publication criteria were used for this paper of systematic literature review, providing a broad presentation on the genus *Aristolochia* and the species *A. triangularis*.

3. Results and Discussion

3.1. Medicinal plants and herbal medicines

In 1967, the first regulation on the use of herbal medicines was published, but only on January 31, 1995, the first change in the registration of these products in Brazil was made by Administrative Rule SVS/MS No. 6, which established deadlines for

pharmaceutical industries to test and disclose data on therapeutic efficacy and safety in the use of herbal medicines [10].

Afterward, four other changes were made to the document, respectively: RDC nº 17, of February 24, 2000 [11], which stated on the registration of herbal medicines and natural products; RDC nº 48, of March 16, 2004, in which the Technical Regulation was approved, updating new standardization for the renewal of the registration of herbal medicines registered before the year 1995, making the reports of efficacy, safety and quality control mandatory [12]; Subsequently, in RDC No. 14, March 31, 2010, inserted, as praxes, consultations with pharmacopeial methodologies, national and international, highlighting new requirements for evaluation of aflatoxins and physical-chemical tests of plant products [10]; and finally, in RDC No. 26, May 13, 2014, which provides for registrations of the categories of traditional herbal medicines and products and renewals [13].

The WHO defines medicinal plant as "any plant that possesses, in one or more organs, substances that can be used for therapeutic purposes or that are precursors of drugs" [14]. Therefore, the main difference between medicinal plants and herbal medicine is in the preparation of the plant for a specific formulation, which characterizes an herbal medicine [15]. This is corroborated by Administrative Rule no. 6 of January 31, 1995, published by ANVISA, which defines herbal medicines as "all drugs technically obtained and prepared exclusively with vegetable raw materials and with prophylactic, curative or diagnostic purposes" [16].

In historical terms, the use of plants for medicinal purposes for the prevention and treatment of diseases is one of humanity's oldest empirical practices [17], and besides being used as medicines, plants are also consumed as food throughout the world. In spite of this, in the previous studies by Raynor and collaborators [18], it was shown that approximately three-quarters of commercial herbal products lacked safety information for use. And despite the wide consumption of these plants as medicines, the use of these resources occurred without proper scientific proof of their pharmacological properties and toxicological potential [16].

Moreover, contextualized as a serious public health problem, the toxic potential of medicinal plants and their adverse effects are often associated with risks of hypersensitivity and intoxications, besides drug interactions with other allopathic drugs that cause possible synergistic or antagonistic actions [19]. However, research

to evaluate the safe use of medicinal plants and herbal medicines in Brazil is still incipient, as well as the commercial supervision and control by official agencies [19].

Hence, pharmacological studies in association with ethnobotanical, chemical, and agronomic research make it possible to expand scientific knowledge of medicinal plants, elucidate their biological actions, their toxic and side effects, as well as their interactions with allopathic drugs. Not only that, but they also contribute to the development of strategies for quality control and production of herbal medicines [20].

3.2. Family Aristolochiaceae

The family Aristolochiaceae belongs to the order Piperales [21, 4] according to several classification systems proposed for Aristolochiaceae (Table 1) [22, 23]. The species of this family are characterized by a group of flowering plants, with a predominant distribution of tropical and subtropical regions on the planet [24, 4, 25]. However, according to Nogueira & Lopes [4] the taxonomic classification is still controversial and needs further systematic studies, associated with molecular data for elucidation and correct identification.

Table 1. Taxonomic classification of the species *Aristolochia triangularis*

Class	Angiospermae
Subclass	Magnoliídea
Order	Piperales
Superorder	Magnoliiflorae
Family	Aristolochiaceae
Genus	<i>Aristolochia</i>
Species	<i>Aristolochia triangularis</i>

Source: Authors (2021).

The taxonomy of Aristolochiaceae has changed considerably with the advance of molecular phylogenetics, as have several other groups of angiosperms. Usually, the family Aristolochiaceae is divided into two subfamilies: *Asaroideae*, which includes the genera *Asarum* and *Saruma*; and *Aristolochioideae*, which includes the genera *Aristolochia* sensu lato (s.l) and *Thottea* [23]. Review studies described by Gonzalez & Stevenson [22], proposed to observe the phylogenetic relationships of Aristolochiaceae based on cladistic analysis of morphological characters and divided

Aristolochia sensu lato into four genera, these being: *Aristolochia* s. str., *Pararistolochia*, *Endodeca*, and *Isotrema* distributed in two subtribes [22].

This analysis corroborates the phylogenetic reconstruction of the family *Aristolochiaceae* proposed by Ohi-Toma and collaborators [23], which was based on comparisons of nucleotide sequences, morphological characters, and other molecular data. According to data from all reconstructed phylogenetic trees, it is suggested that *Aristolochia* (s.l) is monophyletic and organized especially into two lineages, being: *Aristolochiinae* and *Isotrematinae*. By Gonzalez & Stevenson [22], both are divided into two further sublineages, with *Aristolochiinae* subsequently subdivided into *Aristolochia sensu stricto* and *Pararistolochia*, and the *Isotrematinae* clade branching into *Isotrema* and *Endodec* [23].

Regarding the Brazilian *Aristolochiaceae*, several are used in popular medicine, and it is possible to highlight the following described therapeutic potentials: 1) Anti-inflammatory, anti-rheumatic, and antiseptic (*Aristolochia triangularis*) [26]; 2) Antiphidic, sudorific, bronchodilator and abortifacient (*Aristolochia birostris*) [27]; 3) Antimicrobial (*Aristolochia longa* L.) [28]; 4) Treatment of gastrointestinal disorders (*Aristolochia trilobata* L.) [29]; 5) Hypotensive, antimalarial and anti-diabetes (*Aristolochia triangularis* and *Aristolochia esperanzae*) [30, 31] (Table 2).

Table 2. Species of the genus *Aristolochia* and their applications

Species	Part Used	Bioactivities/Conditions Treated	Reference
<i>Aristolochia cymbifera</i>	Stalk, Leaves	Antibacterial action with attenuation of gastrointestinal disturbances.	[32] Silva et al., (2013)
<i>Aristolochia triangularis</i>	Stem,Leaves	Antibacterial action, inhibition of viral replication and antiproliferative activity.	[33] Oliveira et al., (2019), [34] Mongelli et al., (2000)
<i>Aristolochia gigantea</i>	Roots, Whole plant	Treatment of African trypanosomiasis, Skin diseases, emmenagogue and abortifacient.	[35] Vahekeni et al., (2020), [36] Rodriguez, (2010)
<i>Aristolochia indica</i>	Roots	Emmenagogue, abortifacient, diuretic, anti-inflammatory, sedative, anthelmintic, treatment of poisonous bites.	[37] Chopra et al., (1956), [38] Mukerji (1953)

<i>Aristolochia elegans</i>	Whole plant	Antimitotic, antiviral, emmenagogue.	[39] Wu et al., (2004), [40] Shaw, (1947)
<i>Aristolochia brasiliensis</i>	Aerial Parts	Menstrual cramps, uterine inflammations.	[41] Albuquerque et al., (2007).
<i>Aristolochia ringens</i>	Roots	Antidiabetic action, anticancer activity.	[42] Sulyman et al., (2016), [43] Akindele et al., (2015)
<i>Aristolochia clematitis</i>	Whole plant, Rhizome	Anti-rheumatic and anti-arthritis.	[44] Xaio, (1983), [45] Nelly et al., (2008).
<i>Aristolochia bracteata</i>	Roots	Gastric stimulant, anticancer, lung inflammation, dysentery and snakebites.	[46] Negi et al., (2003)
<i>Aristolochia tagala</i>	Roots	Fever, intestinal problems, ulcers, skin diseases, snakebites, emmenagogue, abortifacient, antineoplastic, antiseptic agent, anti-inflammatory, antimicrobial, antifertility.	[47] Rajani & Pooja (2020)

3.3. The genus *Aristolochia* (s.l) and the species *A. triangularis*: pharmacological data

Currently, from the Brazilian flora, about 92 species of the genus *Aristolochia* (s.l) are known, which represents the most numerous of the family Aristolochiaceae [48,4]. Also, the species of *Aristolochia* (s.l), are of the type: herbs, shrubs, sub-shrubs, and voluble climbers. (Figure 1) Its floral morphology includes a monochlamydeous perianth, zygomorph, with petaloid sepals, organized and fused into a tubular structure composed by the lower tube and upper tube [49].



Figure 1. Overview of *Aristolochia triangularis*.

The terminal portion of the upper tube is connected to the lips that border the fauce, and subsequently, the androecium and gynoecium are fused with the gynostemium and infertile ovary [49]. These characteristics attributed to the species of the genus make the adaptations possible regarding the mechanism of pollination by various groups of Diptera (Figure 2). Of these species, most inhabit forest edges, however, some also occur in open regions and are recorded in the phytogeographic domains: Amazon, Caatinga, Cerrado, Atlantic Forest, and Pampa [50].

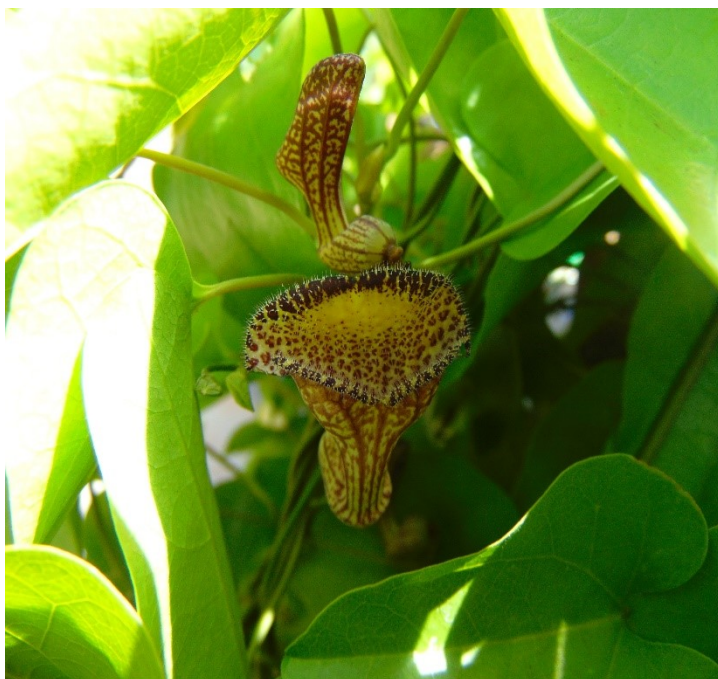


Figure 2. Branches of *A. triangularis* with flowers.

Within this context is the species *Aristolochia triangularis* Cham, which is an ethnobotanical species, since it has more than one popular name: it is popularly called "cipó mil-hombres", "mil hombres", "cipó-mil-hombres" in Argentina and Paraguay, and "Cipó-mil-homens" or "cipózinho-prá-diabete" in Brazil. This plant is native to South America and has been recorded in the south, southeast, and midwest regions of Brazil, and has also been reported in Paraguay and Argentina [30, 22].

A. triangularis is of common occurrence in Brazil and has a considerable history of use in folk medicine for the treatment of diabetes, and is also indicated for several other medicinal purposes, including the treatment of rheumatism, infections, skin diseases and wounds [8, 2]. According to Trojan-Rodrigues and collaborators [2], the plant organ of *A. triangularis* used to treat diabetes is the leaf (Figure 3), as it is chemically characterized by a predominance of lignoids, terpenoids, alkaloids, alkamides, and flavonoids [51].



Figure 3. Branches of *A. triangularis* with leaves.

Several other medicinal purposes are attributed to *A. triangularis*. For example, the study developed by Bolson and collaborators [30] broadly reveals that the species is popularly used to treat diseases of the gastrointestinal system, obstetrics, gynecological, and urinary tract diseases, besides being useful in the treatment of cardiovascular diseases, musculoskeletal and joint diseases.

Additionally, *A. triangularis* is used for treatments such as antidiabetic, anti-inflammatory, circulatory system, venous detoxification, against impotence, for flu, skin hematomas, nicotine control and withdrawal, antirheumatic, antiseptic, decongestant, migraine, stomach pain, menopause, and as an abortion antidote [52, 53].

Among the main ethnopharmacological studies described in the literature, the investigation of the therapeutic potential and pharmacological biosafety of *A. triangularis* stands out. For example, it has been found that the dichloromethane extract of roots of the plant species has anti-inflammatory efficacy similar to the action of the commercial drug phenylbutazone. Besides, it is also used for medicinal purposes and its consumption is in the form of tea, in this case, after making an

infusion of the leaves. However, the use of decoction, maceration, and even the use of ethanol to assist in home extraction is also observed [54].

As described by Nogueira & Lopes [4], previous reports suggest that preparation methods can vary widely, although the following preparation proportions are more frequent and with significance: i) 5 and 50g (estimated measurements of a teaspoon and a cup, respectively) of plant/L of water and ii) 0.01 g/mL (1%; w/v) to 0.4 g/mL (40%; w/v), with emphasis on the proportion of 10% (w/v). In other reports, the activity of leaf extracts of this plant is observed, with cytotoxic action and interaction with DNA. Besides cytological effects induced by infusions of *A. triangularis* branches [55, 56].

Other studies evidenced the effects of decoction of secondary stems on the cell cycle of *Allium cepa* meristems and the antimycobacterial activity of a hydroalcoholic beverage prepared from the plant [57]. Data published by Pereira and collaborators [9] demonstrated that the methanolic extract of rhizomes and roots of *A. triangularis*, as well as some substances isolated from it, possessed promising bioactivities against microbial pathogens and, in certain cases, comparable or better than the action of ampicillin and chloramphenicol [9].

Recently, Silva and collaborators [58] investigated the aqueous extract of *A. triangularis* and observed cytotoxic action by *Artemia salina* and *Allium cepa* bioassays. In summary, the studies propose that further bioassays should be conducted for validation in safe use, in addition to exploring the pharmacological potential of this plant species.

3.4. Chemical composition and metabolomic aspects

The chemistry of the Aristolochiaceae family has been widely studied and some review research describes several classes of secondary metabolites, the most frequent being: lignoids, terpenoids, alkaloids, alkamides, and flavonoids [59, 60].

According to Nogueira [51], the metabolomic profiles of the Brazilian species of Aristolochiaceae differ significantly, as well as the micromolecular categories that are specific in each species, for example, the presence of bicubebins in *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens* and, bi- and tetraflavonoids in *Aristolochia ridicula*, in addition to aristolochic acids and furofuran and butyrolactone lignans, are common in most species of this genus [61].

The main findings regarding the chemical composition of the stems, rhizomes, leaves, and roots of *A. triangularis* showed a total of 48 compounds - one furofuranic lignan, one dibenzylbutanic lignan, ten dibenzylbutyrolactonic and two dibenzylbutyrolactonic lignans, three triterpenes, twelve cauranic diterpenes, two aporphinic alkaloids, three dioxoaporphinic alkaloids, one tetrahydrobenzylisoquinolinic alkaloid, eight aristolactams, and five aristolochic acids - not extractable by steam dragging, have been described to occur in this species [62, 63, 64, 65, 9].

Among them, only aristolactam I and aristolochic acids I, II, C, and D have so far been identified in *A. triangularis* leaves by LC-MS- and NMR-based metabolomic analyses. Recent studies have shown that special and common metabolites in the genus *Aristolochia* possess a broad spectrum of biological activities, as an example: i) aryltetralonic lignans isolated from *Aristolochia holostylis* showed antiplasmodial potential [66], ii). While aristolamide II, originating from *A. manshurienses*, showed anti-inflammatory activity [67]. iii) And the neolignan licarina A was potentially active against tuberculosis [68]. iv) Studies with methanolic extract of leaves of the species *A. cymbifera* revealed that metabolites present in this plant organ showed activity against promastigotes of *Leishmania chagasi*. And subsequently, after fractionation of these compounds, the diterpene copalic acid demonstrated high toxicity under the parasite *L. chagasi* [69]. v) And with isolation of cauranic diterpenes and cubetin lignans from *A. triangularis*, after exposure of the metabolites, antidiabetic, analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activity were observed [70].

Reports found in the literature also show that the majority component in *A. triangularis* leaves is caryophyllene, which has a mild aroma, a fruity, sweet form. However, most of the plant is composed of approximately twelve types of sesquiterpenes such as α -cadinol and β -caryophyllene, some monoterpenes such as p-cymene, simple hydrocarbons such as decane and dodecane, aristolochic acids, and a good diversity of cubetin lignans and cauranic diterpenes [63].

It is important to note that despite the presence of metabolites with promising biological activities for therapeutic use, there are also other micromolecules common to the *Aristolochiaceae* family, such as aristolochic acids I and II, which are associated with genotoxic, carcinogenic, and nephrotoxic effects according to recent scientific evidence [71,65].

3.5. Aristolochic acids and aristolactams

Currently, aristolochic acids (AA) and aristolactams (AL) are characterized as phenanthrene derivatives. These feature structures containing a carboxylic acid group (-COOH) attached at C-1 and a nitro group (-NO₂) or a lactam group (CONH) at C-10, respectively [58].

AA is the generic name used to represent the family of nitrophenanthrene carboxylic acids or aristolochic acids. Chemically, AA is mainly composed of the mixture of two metabolites: 8-methoxy-6-nitro-phenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylic acid (AAI) and ido-6-nitro-phenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylic acid (AAII) [51].

These substances are widely distributed in species of the Aristolochiaceae family, mainly in the genera *Aristolochia* and *Asarum* [51]. Among the special metabolites described in species of *Aristolochias*, the most recurrent in research reports are aristolochic acids (AA's) and aristolactam (derived from the acids). This large number of publications is justified, thanks to the concern regarding the mutagenic potential in association with nephrotoxic activity, attributed to AA's, and as a consequence, they cause renal disorders and diseases and have carcinogenic tendencies [8, 72, 48].

The biochemical mechanism associated with the carcinogenesis and nephrotoxicity of AA's is due to the chemical binding that the nitrene ion of aristolactam makes with guanine and the adenine of the cells' DNAs (Figure 4). Such acquired mutations are not repairable by cells and subsequently promote nephrotoxicity and possible DNA damage [71, 72]. The analyses conducted by Heinrich and collaborators [8], highlighted that the increasing number of evidence in China and Europe associate the action of AA's with nephropathy [72].

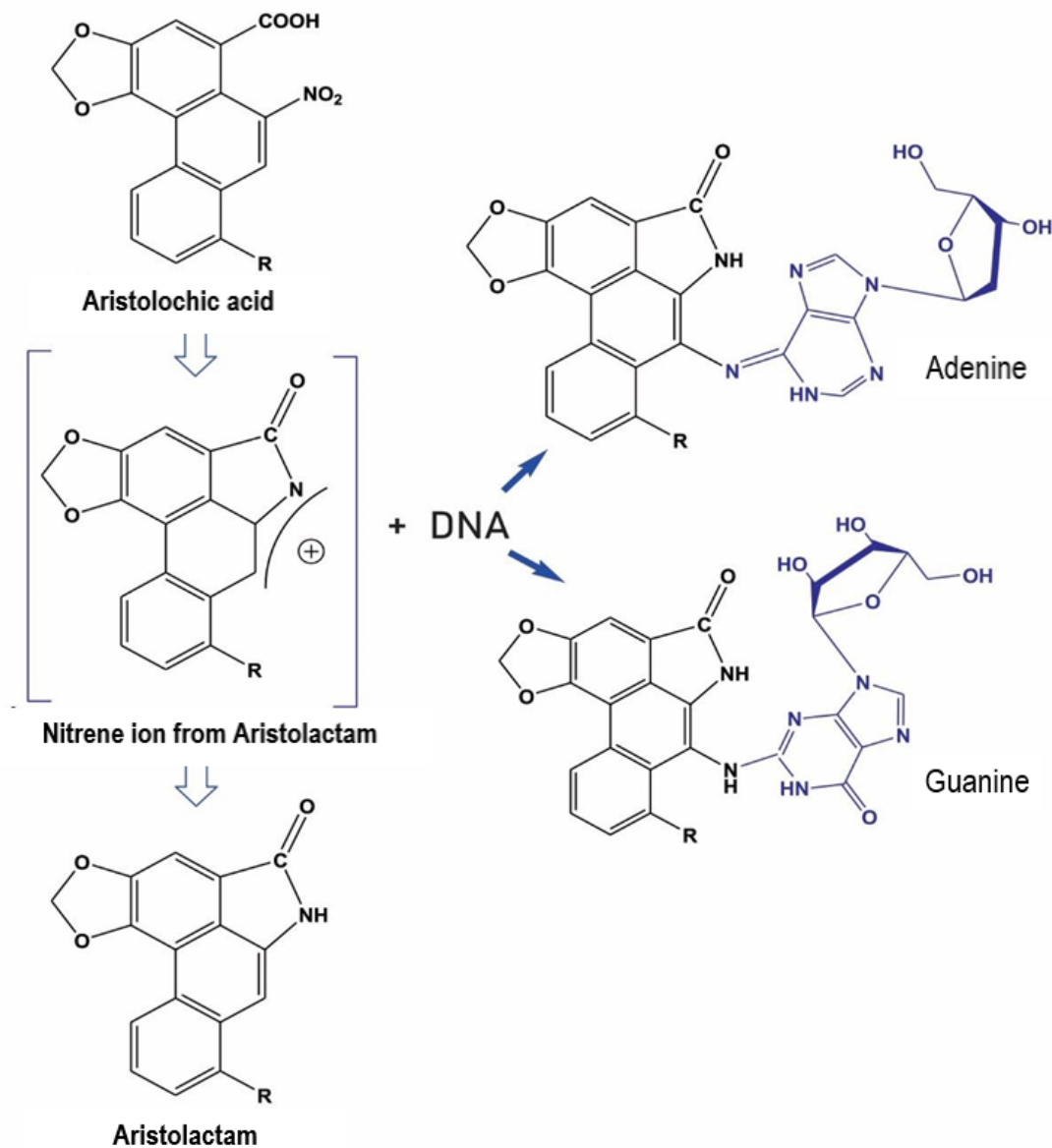


Figure 4. Schematic of the interaction of aristolochic acids with DNA molecules.

3.6. Phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity

According to the biosynthetic route, secondary metabolites are classified into three main groups, namely: 1) Alkaloids, which are characterized by the presence of a nitrogen atom attached to cyclic structures and composed of five or six carbon atoms; 2) Terpenes and steroids, consisting of isoprenoid precursor units and formed by the arrangement of five carbon atoms; and 3) Phenolic compounds, which represent compounds with an aromatic ring replaced by one or more hydroxyl groups

(-OH). However, this chemical group is characterized by great structural diversity. Furthermore, there are as many other metabolites that do not fit into any of the three groups [73].

The phenolic compounds distributed abundantly in plants are flavonoids, formed by one or more aromatic nuclei, containing hydroxyl substituents and/or functional derivatives (esters and glycosides) [74]. Flavonoids are biosynthesized from a fundamental unit called 2- phenylbenzopyrone, which consists of 2 phenolic rings attached to a 3-carbon atom bridge (Figure 5) [73]. These compounds occur in two distinct forms: in conjugation with sugars (heteroside or glycoside) and the free form, without bonds with sugars (aglycone or genin). In the latter form, the bond between genin and sugar usually occurs via a hydroxyl (O-heteroside) or a carbon atom (C-heteroside) [75].

In the world, several researchers highlight the antioxidant activity observed in flavonoids and their subclasses. Antioxidant compounds are represented by agents capable of donating free radicals, electrons, or hydrogen atoms; moreover, they have a preventive or inhibitory action on the formation of reactive species and mitigate oxidative stress [76, 77].

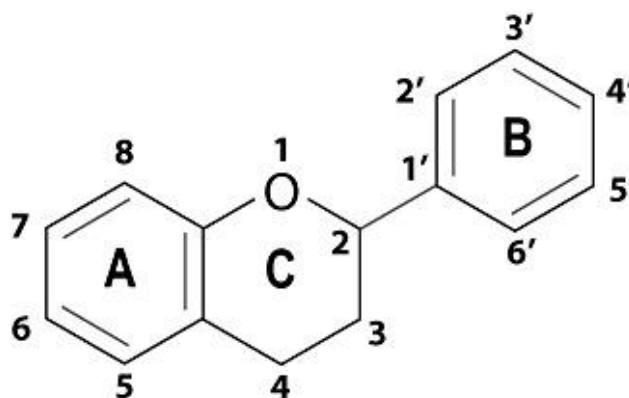


Figure 5. Basic structure of a flavonoid. Source: Adapted from HEIM et al (2002).

Many other pharmacological activities are attributed to flavonoids, such as secretory processes of the inflammatory response, activity on enzymes, antimicrobial,

antithrombotic, antiallergic receptors or carriers, antioxidant action, and regulatory activities in pancreatic β cells, with hypoglycemic action [72, 76, 75, 77].

4. Conclusion

Based on the systematic review of *Aristolochia triangularis*, it is suggested that this species has significant nutritional, medicinal, cultural, and economic value. Although it is widely used in folk medicine, and even though some studies on its pharmacological effects are under development, there is a notorious lack of research to corroborate the biological effects described by empirical use, or more detailed descriptions about the phytoconstituents of each species. Moreover, it is also noted the absence of a toxicological evaluation, as recommended by the regulatory agencies of drugs, medicinal plants, herbal medicines, and natural products in the country. Thus, this research highlights the need for further studies on the use of the species and its pharmacological and toxicological effects.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] A. Sousa, A. Santos, R. Rocha, Plantas Medicinais em Enfermagem: Os Saberes Populares e o Conhecimento Científico, Rev. Eletrônica Extensão em Debate. 6 (2019) 48–67.
- [2] M. Trojan-Rodrigues, et al., Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil, J. Ethnopharmacol. 139 (2012) 155–163.
- [3] R. Marles, N. Farnsworth, Antidiabetic plants and their active constituents, Phytomedicine. 2 (1995) 137–165.
- [4] C.R. Nogueira, L.M.X. Lopes, Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*, Quim. Nova. 35 (2012) 780–782.
- [5] Jr.L. Capellari, Aristolochiaceae, In: J.A. Rizzo (ed.) Flora dos Estados de Goiás e Tocantins. Coleção Rizzo. Goiânia, Universidade Federal de Goiás, 27 (2001) 1–34.
- [6] D. Nitzsche, M.F. Melzig, V.M. Arlt, Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I – A component of Aristolochiaceae plant extracts used in homeopathy, Environ. Toxicol. Pharmacol. 35 (2013) 325–334.
- [7] World Health Organization–WHO. 2004. Aristolochic acid. WHO Pharmaceuticals Newsletter, v.5, 2004. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js8114e/1.2.html>. Acesso em: 13 fev. 2019.
- [8] M. Heinrich, et al., Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2 - A global assessment based on bibliographic sources, J. Ethnopharmacol. 125 (2009), 108–144, 2009.
- [9] A.O. Pereira, et al., Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil, Ind. Crop. Prod. 121 (2018) 461–467.
- [10] Agência Nacional de Vigilância Sanitária–Anvisa. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial União, 2010.
- [11] Agência Nacional de Vigilância Sanitária–Anvisa. Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. Diário Oficial União, 2000.

[12] Agência Nacional de Vigilância Sanitária–Anvisa. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. Diário Oficial União, 2004.

[13] Agência Nacional de Vigilância Sanitária–Anvisa. Resolução-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial União, 2014.

[14] World Health Organization–WHO. 1998. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva: World Health Organization, 1998.

[15] S.M.K. Rates, Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia, Rev. Bras. Farmacogn. 11 (2001) 57–69.

[16] Agência Nacional de Vigilância Sanitária–Anvisa [Online]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/A+assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>. Acesso em: 26 jan. 2020.

[17] M.D.O. Santana, et al., O poder das plantas medicinais: uma análise histórica e contemporânea sobre a fitoterapia na visão de idosas, Multidebates. 2 (2018) 10–27.

[18] D.K. Raynor, et al., Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use?, BMC Medicine. 9 (2011) 1–9.

[19] V.F. Veiga Junior, et al., Medicinal plants: safe cure?, Quim. Nova. 28 (2005) 519–528.

[20] G.K. Traesel, et al., Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. J. Med. Food. 20 (2017) 804–811.

[21] R. Berjano, F. Roa, S. Talavera, M. Guerra, Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. Plant. Syst. Evol. 280 (2009) 219–227.

[22] F. González, D.W. Stevenson, A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae), Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat. 26 (2002) 25–60.

[23] T. Ohi-Toma, et al., Molecular Phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers, Syst. Bot. 31 (2006) 481–492.

- [24] S. Wanke, F. González, C. Neinhuis, Systematics of Pipevines: combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae), *Int. J. Plant. Sci.* 167 (2006) 1215–1227.
- [25] C.M. Li, Y. Wang, A New Record of *Asarum* (Aristolochiaceae) in Shaanxi and Its Karyotype, *J. Anhui. Agric. Univ.* 2014 (2014).
- [26] C. Corrêa, L. Biasi, Área foliar e tipo de substrato na propagação por estaquia de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham. Et Schl.), *J. Agric. Sci. Technol.* 9 (2003) 233–235.
- [27] V.C França, et al., Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae), *Rev. bras. farmacogn.* 15 (2005) 326–330.
- [28] M. Dhouioui, et al., Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity, *Ind. Crop. Prod.* 83 (2016) 301–306.
- [29] M.A.F. Gois, et al., Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal, *Rev. Bras. Plantas Med.* 18 (2016) 547–557.
- [30] M. Bolson, et al., Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil, *J. Ethnopharmacol.* 161 (2015) 1–10.
- [31] C.F. De Alvarenga, et al., Uso de plantas medicinais para o tratamento do Diabetes Mellitus no vale do Paraíba-Sp, *Rev. Ciência e Saúde On-Line*, 2 (2017) 36–44.
- [32] W. F. Silva, et al., Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potential antibacterial drug, *SpringerPlus.* 2 (2013) 1–7.
- [33] S.Q. Oliveira, et al., Chemical Constituents and Pharmacology properties of *Aristolochia triangularis*: a south brazilian highly-consumed botanical with multiple bioactivities. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 91 (2019) 1–12.
- [34] E. Mongelli, et al., Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 145–151.
- [35] N. Vahekeni, et al., Use of herbal remedies in the management of sleeping sickness in four northern provinces of Angola, *J. Ethnopharmacol.* 256 (2020) 112382.

- [36] I.I.G. Rodriguez, Avaliação da Atividade antiofídica de *Aristolochia sprucei*: Isolamento e caracterização estrutural de composto bioativo. 2010. 109p. Tese (Doutorado - Área de concentração em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- [37] R.N. Chopra, S.L. Nayer, Glossary of Indian Medicinal Plants, Council of Scientific & Industrial Research, New Delhi, 1956, p. 24.
- [38] B. Mukerji, The Indian Pharmaceutical Codex Vol. 1–Indigenous Drugs, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India, 1953, p. 21.
- [39] J.B. Schwartzman, et al., Cytological effects of some medicinal plants used in the control of fertility, *Experientia*. 33 (1977) 663–665.
- [40] F.H. Shaw, The pharmacological testing of alkaloids from Australian flora, *Aust. J. Pharm.* 28 (1947) 857.
- [41] U.P. Albuquerque, et al., Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach, *J. Ethnopharmacol.* 114 (2007) 325–354.
- [42] A.O. Sulyman, et al., Antidiabetic potentials of ethanolic extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) roots, *J. Ethnopharmacol.* 182 (2016) 122–128.
- [43] A.J. Akindede, et al., Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae), *J. Tradit. Complement. Med.* 5 (2015) 35–41.
- [44] P. Xaio, Recent developments on medicinal plants in China, *J. Ethnopharmacol.* 7 (1983) 95–109.
- [45] A. Nelly, et al., Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon, *J. Ethnopharmacol.* 120 (2008) 315–334.
- [46] P.S. Negi, C. Anandharamakrishnan, G.K. Jayaprakasha, Antibacterial activity of *Aristolochia bracteata* root extracts, *J. Med. Food.* 6 (2003) 401–403.
- [47] M.B. Rajani, et al. review on medicinal uses, pharmacology and phytochemistry of *Aristolochia tagala* Cham, An endangered medicinal plant. *JPP.* 9 (2020) 580–583.
- [48] F.C. Hoehne, Flora brasílica: Aristolochiaceae. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 15 (1942) pt. 2.
- [49] F.C. Hoehne, Monographia illustrada das Aristolochiaceas brasileiras, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 20 (1927) 67–175.
- [50] V.C. Souza, H. Lorenzi, Botânica sistemática: um guia para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

- [51] C.R. Nogueira, Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso: compostos nitrados. 2010. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Química) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- [52] M.M. Baptista, et al., Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil, *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 9 (2013) 1–16.
- [53] M. Kujawska, N.I. Hilgert, Phytotherapy of Polish migrants in Misiones, Argentina: Legacy and acquired plant species, *J. Ethnopharmacol.* 153 (2014) 810–830.
- [54] C. Battisti, et al., Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil, *Rev. Bras. Biociênc.* 11 (2013) 338–348.
- [55] T.S. Wu, et al., Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities, *Nat. Prod. Rep.* 21 (2004) 594–624.
- [56] A.G. Amat, et al., Evaluation of cytological parameters induced by aqueous extracts of seven plants used as antihypertensive agents in Argentine folk medicine, *Acta. Farm. Bon.* 21 (2002) 37–42.
- [57] J.D.A. Silva, et al., Toxicological properties of an aqueous extract of *Aristolochia triangularis* leaves, using the brine shrimp lethality and *Allium cepa* bioassays, *Cienc. Rural, Santa Maria.* 49 (2019) e20190091.
- [58] A.G. Pacheco, et al., ¹³C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. *Molecules*, 14 (2009) 1245–1262.
- [59] C.S. Francisco, et al., Classification of *Aristolochia* species based on GC–MS and chemometric analyses of essential oils, *Phytochemistry.* 69 (2008) 168–175.
- [60] G. Rücker, et al., Inhaltsstoffe von *Aristolochia triangularis*, *Planta Med.* 41 (1981) 143–149.
- [61] H.A. Priestap, A.L. Bandoni, Investigation of the Essential Oils from *Aristolochia triangularis*, *J. Essent. Oil. Res.* 2 (1990) 95–98.
- [62] W. Lin, et al., Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (L), *J. Chin. Pharm. Sci.* 6 (1997) 8–13.
- [63] J. Michl, et al., LC-MS- and ¹H NMR-based metabolomic analysis and in vitro toxicological assessment of 43 *Aristolochia* species, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 30–37.
- [64] T. Da Silva, L.M.X. Lopes. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*, *Phytochemistry.* 67 (2006) 929–937.

[65] Y.M. Chung, et al., A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*, *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 1792–1794.

[66] R. León-Díaz, et al. Antitubercular Activity and the Subacute Toxicity of (-)-Licarin A in BALB/c Mice: A Neolignan Isolated from *Aristolochia taliscana*, *Archives of Medical Research.* 44 (2013) 99–104.

[67] A.G. Tempone, et al., Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds, *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 103 (2008) 443–449.

[68] S.T. Guetchueng, et al. Kaurane Diterpenes from the Fruits of *Zanthoxylum leprieurii* (Rutaceae), *Rec. Nat. Prod.* 11 (2017) 304–309.

[69] J. Michl, et al., Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 676–93.

[70] I. Jadot, et al. An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–24.

[71] J.B. Harbone, et al. *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants.* 2 ed. London: Taylor and Francis, 1999.

[72] V.D. Kappel, et al., Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle, *J. Pharm. Pharmacol.* 65 (2013) 1179– 1186.

[73] O.M. Andersen, K.R. Markham, *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications.* USA: CRC Press, 2006.

[74] T.B. De Vasconcelos, et al., Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?, *J. Health. Sci.* 16 (2014) 213–219.

[75] B.M. Moukette, et al., Antioxidant and Synergistic Antidiabetic Activities of a Three-Plant Preparation Used in Cameroon Folk Medicine, *Int. Sch. Res. Notices.* 2017 (2017) 2–7.

[76] K.S.L. Mota, et al., Flavonoids with gastroprotective activity, *Molecules.* 14 (2009) 979–1012.

[77] H. Rasouli, et al. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes, *Food. Funct.* 8 (2017) 1942–1954.

6.2. Artigo II: Evaluation of the toxicity acute and toxicogenetic potential immunomodulatory of aqueous extract from *Aristolochia triangularis* leaves

Submetido em Journal of Ethnopharmacology. Fator de Impacto 4.36. Qualis A2 em Medicina II.

Data da Submissão: 18/07/2021.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

Evaluation of the toxicity acute and toxicogenetic potential immunomodulatory of aqueous extract from *Aristolochia triangularis* leaves

Flávio Henrique Souza de Araújo^{a*}, Cláudio Rodrigo Nogueira^b, Larissa Pires Mueller^a, Suzana Queiróz Velter^b, Fernando Freitas de Lima^c, Pamella Fukuda de Castilho^a, Kelly Mari Pires de Oliveira^d, Zaira da Rosa Guterres^e, Silvia Aparecida Oesterreich^a.

^a *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: flaviobiosmart@gmail.com, pamellafcastilho@gmail.com; silviaoesterreich@gmail.com; Phone: +55 (67) 3410-2001*

^b *Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: claudiornogueira@ufgd.edu.br. Phone: + 55 (67) 3410-2081*

^c *Center of Dairy Technology, Institute of Food Technology, Campinas, São Paulo, Brazil. Email: flfernando@hotmail.com; Phone: +55 (19) 3521-6727*

^d *Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: kellyoliveira@ufgd.edu.br Phone: + 55 (67) 3410-2320*

^e *Laboratory of Phytogenesis and Mutagenesis of the State University of Mato Grosso do Sul, Mundo novo, Mato Grosso do Sul, Brazil. Email: zairaguterres@yahoo.com.br; Phone: +55 (67) 3923-3181*

***Authors to whom correspondence should be addressed**

Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados. Rodovia Dourados – Itahum, Km 12. Mato Grosso do Sul, Brazil. Tel number : +55-67-3410-2001, E-mail addresses flaviobiosmart@gmail.com

Authors' contributions

Flávio Henrique Souza de Araújo^{a*}, Cláudio Rodrigo Nogueira^b, Silvia Aparecida Oesterreich^a: Responsible for conducting the experiments and developing the research (extract preparation, administration of the treatments in the rats, maintenance of the animals, organization of the experiments). In addition, they collaborated with the maintenance of the animals in the sectoral vivarium of the university.

Flávio Henrique Souza de Araújo^a and Zaira da Rosa Guterres^e: Responsible for development of the SMART test.

Suzana Queiróz Velter^b; Pamella Fukuda de Castilho^a, Kelly Mari Pires de Oliveira^d: Responsible and collaborated for with the development of the Ames test.

Flávio Henrique Souza de Araújo^a and Fernando Freitas de Lima^c: Collaborated with the development of the test toxicity acute.

All authors contributed to the writing and review of the article.

¹Abbreviations

¹Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; BH: balanced heterozygous individuals; flr3: Flare; HB: high bioactivation cross; LD50: lethal dose; LOH: loss of heterozygosity; MH: transmarker heterozygous individuals; MN-PCEs: micronucleated polychromatic erythrocytes; mwh: Multiple wing hairs; NCEs: normochromatic erythrocytes; OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; Inf-L-At: freeze-dried infusion from *Aristolochia triangularis* leaves; PCEs: polychromatic erythrocytes; PCEs/NCEs: ratio of polychromatic and normochromatic erythrocytes; SEM: standard error of mean; SMART: Somatic mutation and recombination test; ST: standard cross; UDP, Up-and-Down Procedure; UFGD: Federal University of Grande Dourados; WHO, World Health Organization.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Aristolochia triangularis* is among the most emblematic Brazilian plants from an ethnobotanical point of view. It has multiple medicinal uses, for example, teas of its leaves are indicated for diabetes control. As with any *Aristolochia* plant, the consumption of this species is polemic and raises pharmacological safety issues, most of them still unanswered, as toxicological studies involving aqueous preparations of *A. triangularis* remain scarce. **Aim of the study:** This study aimed

estimation LD50 and investigating the toxicogenetics and immunomodulatory effects of the freeze-dried infusion from *A. triangularis* leaves (Inf-L-At) *in vitro* and *in vivo* assays

Materials and methods: Their acute toxicity was evaluated following oral administration to female rats at a single dose of 2 g/kg b.w. The mutagenic potential, in turn, was evaluated at doses of (0.62, 1.25; 2.5; 5mg/mL) in Ames test in the presence and absence of activation, as well as by the SMART test (test for detection of mutation and recombination) using standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses in *Drosophila melanogaster* wings. A total of 50 *Wistar* rats of both sexes was used for the *in vivo* genotoxicity and mutagenicity assays, which were subdivided into five experimental groups (5 animals of each sex): the animals of the negative control group were treated with 1 mL vehicle via oral (v.o); three groups (Inf-L-At) were treated with doses of (62.5, 125 and 250 mg/kg b.w, v.o); and the positive control group received via intraperitoneal (50 mg/kg b.w of cyclophosphamide), liver and kidneys were analyzed in the apoptosis assay, and the spleen was selected for the splenic phagocytosis assay. **Results:** The freeze-dried aqueous extract showed genotoxic potential *in vivo* e *in vitro*. Although Inf-L-At exhibited cytotoxicity, the effects observed were less severe when compared to CP, which had a PCEs / NCEs ratio of 0.19 in females and 0.21 in males. In the groups exposed to the infusion, the ratio varied between 0.35-0.38 in females and 0.32-0.44 in males. There was an increase in genotoxic

effects at concentrations of 2.5 and 5.0 mg/mL, therefore they acted similarly to DXR, with percentage induction of mutant spots of 61.1 and 69.56 in the ST cross, and 54.54 and 74.35 in the HB cross at the respective higher concentrations. The lowest concentration is not genotoxic. These results corroborate the mutagenic potential identified in the TA100 strains in (S+) by microsomal fraction, at different concentrations. DNA lesions were observed in animals of both sexes by the comet assay, in addition to immunostimulatory effects, with lymphocyte recruitment to the spleen, phagocytosis and apoptosis mechanisms were effective, in response to the increased formation of micronuclei in peripheral blood and in bone marrow. **Conclusion:** The results suggest caution in the indiscriminate use of *A. triangularis*, as in addition to the risks of intoxication, there are evidences of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. However, it is suggested that further studies be carried out to elucidate the pharmacological potential and screening of the chemical constituents with toxic and/or bioactive potential, in favor of safe use.

Keywords: Cipo-mil-homens; Cytotoxicity; Ames test; Micronucleus; Comet assay; SMART test.

Introduction

Cerrado, the second largest biome in Brazil, is characterized by its wide territorial extension, with the world's greatest biodiversity. The abundant richness of plant species has sociocultural importance and many plants are used as raw material for food production (Reis; Schmiele, 2019), or for therapeutic purposes (Adeniyi et al., 2018). However, despite the exponential worldwide increase in the use of medicinal plants, especially in developing countries, biological and toxicological studies are needed to validate the safe use by the population (ANVISA, 2020).

In this context, the Aristolochiaceae family stands out, consisting of four genera and approximately 600 species predominantly distributed in tropical, subtropical and temperate regions of the planet (Nogueira; Lopes, 2012).

Aristolochiaceae, especially those of the genera *Aristolochia* and *Asarum*, are used for therapeutic purposes (Nitzsche; Melzig; Arlt, 2013). Plants of the genus *Aristolochia* are frequently used to treat cancer, diabetes, gastrointestinal complications, malaria and parasitic diseases, in gynecological, dermatological, cardiovascular and central nervous system conditions (Heinrich et al., 2009).

Although the information available in literature about the pharmacological and toxicological potential of the *Aristolochia triangularis* aqueous extract is still incipient. The chemical characterization of Aristolochiaceae described in literature indicates secondary metabolites belonging to several classes, with frequent presence of lignoids, terpenoids, alkaloids, alkalamides and flavonoids (Kumar et al., 2003; Wu et al., 2004; Pacheco et al., 2009).

The main chemical studies, specifically on *A. triangularis* stems, rhizomes, leaves and roots, have shown a total of 48 compounds - one furan lignan, one dibenzylbutanic lignan, ten dibenzylbutyrolactonic lignans and two dibenzylbutyrolactolic lignans, three triterpenes, twelve kauranic diterpenes, two aporphinic alkaloids, three dioxoaporphinic alkaloids, one tetrahydrobenzylisoquinolinic alkaloid, eight aristolactams, and five aristolochic acids (Rücker et al., 1978, 1981; Lopes et al., 1990; Priestap et al., 1990; Leitão et al., 1991; Lin et al., 1991; Lin et al., 1978, 1981; Lopes et al., 1990; Priestap et al., 1990; Leitão et al., 1991; al., 1997; Michl et al., 2015; Pereira et al., 2018).

These metabolites are common in the genus *Aristolochia* and have a wide spectrum of biological activities. Aryltetralonic lignans isolated from *Aristolochia holostylis* showed antiplasmodic potential (Da Silva; Lopes, 2006). Aristolamide II, present in *A. manshurienses*, showed anti-inflammatory activity (Chung et al., 2011). Neolignan licarin A showed activity against tuberculosis (León-Díaz et al., 2013). Studies with methanol extract from *A. cymbifera* leaves revealed that activity against *Leishmania chagasi* promastigotes, and after the fractionation of these compounds, copalic acid diterpene showed high toxicity on the *L. chagasi* parasite (Tempone et al., 2008). Kauranic diterpenes and cubebin lignans from *A. triangularis* demonstrated antidiabetic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant action (Guetchueng, 2017).

However, in addition to metabolites with promising biological activities for therapeutic use, this genus is also characterized by the presence of aristolochic acids I and II, which are related to severe genotoxic, carcinogenic and nephrotoxic effects (Neoptolemos et al., 2018).

Thus, considering the ethnopharmacological importance of this species, the aim of this study was to investigate the pharmacological safety of the infusion of *A. triangularis*

leaves, evaluating the acute toxicity, genotoxicity, mutagenicity and immunomodulation in rodents, in addition to evaluating the mutagenic potential using Ames test and SMART assay.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and Infusion preparation

To conduct this study, *A. triangularis* Cham. leaves were collected at the Medicinal Plants Garden of the Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil, from July 2017 to September 2018, and stored in freezer at -20°C until heat extraction steps. The plant species was registered (MBML53232) and deposited at the herbarium of the “Prof. Mello Leitão” Museum of Biology (MBML), in the city of Santa Teresa, state of Espírito Santo, Brazil, with CGEN/MMA access register number A1F6637. To prepare the 10% Infusion, the methodology described by Silva et al. (2019) was adopted. Subsequently, the material obtained was diluted in aqueous solution at concentrations of 2 g/kg b.w for acute toxicity tests and 62.5, 125 and 250 mg/kg, respectively, to conduct toxicogenetic and immunomodulation assays.

2.3. In vitro Test

2.3.1. Ames Test

The Ames test was conducted by the pre-incubation method as described by Mortelmans and Zeiger (2000), in accordance with Guideline 471 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD?) (OECD, 1997). *Salmonella Typhimurium* strains were supplied by the Toxicology and Genotoxicity sector of the

Environmental Company of the State of São Paulo (CETESB). To prepare the inoculum, 100 µL of *S. Typhimurium* TA 98 and TA 100 strains were reactivated in 20 mL of Nutrient Broth (Oxoid n. 2) and incubated at 37 °C for 16 hours in incubator with orbital shaking. Strains were then standardized in 650 nm spectrophotometer with final concentration of 1×10^8 bacteria /mL. Subsequently, strains were concentrated by centrifugation (10,000 rpm at 4 °C) for 10 minutes and resuspended in 4 mL of 0.2 M phosphate buffer.

This assay was performed in the presence and absence of microsomal S9 fraction, allowing the test to verify mutagens directly and indirectly. In test tubes without S9 fraction, 50 µL of 0.2 M phosphate buffer were added, and in tubes with the same 50 µL fraction, 5 µL of sample at concentrations of 5000; 1500; 500; 150 and 50 µg/plate and 50 µl of inoculum were added. Tubes were pre-incubated for 90 minutes at 37°C. After the incubation period, 2 ml of top agar (0.6% agar, 0.6% NaCl, 0.05 mM L-histidine, 0.05 mM biotin, pH 7.4, 45°C) were added to tubes and the mixture was poured onto plates with minimal agar (1.5% agar, 50x Voguel-Boner solution and 10% glucose solution). Plates were incubated at 37°C for 48 – 66 h and then, revertant colonies were counted. In the assay with metabolic activation, the positive control was used for both strains: compound 2-anthramino (2-ANTR) (2.5 µg/plate), whereas in assays without metabolic activation: 4-nitro-ophenylenediamino (NPD) (10 µg/plate) for the TA98 strain and sodium azide (2.5 µg/plate) for the TA100 strain, for the negative control, distilled and sterilized water was used, and tests were carried out in triplicate.

2.4. *In vivo* tests

2.4.1. *Wistar* rats

In the experimental design of acute test, 10 female *Wistar* rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighting 184.6-206.0 g were used. The micronucleus, comet assays and immunomodulatory effects the 25 *Wistar* rats female and 25 male (*Rattus norvegicus albinus*) with 8 and 10 weeks of age and a mean weight of 161.4-179.0 g) were used. The animals used in experiments were provided by the Grande Dourados Federal University (UFGD) and housed in polypropylene cages (n=5) in the familiarization and experimentation period under standard conditions (23 ± 2 °C, 50 to 60% humidity and 12-h light and dark cycle controlled by automatic timer) with water and food *ad libitum*. The experimental procedures were in accordance with rules of the Brazilian College of Animal Experimentation and according to guidelines of the Universal Declaration of Animal Rights with the Ethical Principles in Animal Research and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at UFGD (Protocol number 013/2019).

2.4.2. Animals *Drosophila*

For the *in vivo* study, the SMART test used 3 *Drosophila melanogaster* strains carrying specific marker genes and located on chromosome 3, which study was carried out at the Laboratory of Mutagenesis of the Mato Grosso do Sul State University. The model was developed by Graf et al. (1984), and is described as the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), which detects the mutagenic, deleterious and recombinant activity of natural, chemical and synthetic compounds, in addition to being the main test for associative investigations of the genotoxic potential of substances, before and after biotransformation. The advantages of this alternative model are numerous, such as short reproduction periods, significant number of offspring per cross and low maintenance cost (Gaivão et al., 2020).

2.5. Oral acute toxicity test

For the oral acute toxicity test, the protocol was based on Guidelines 425 of OECD: Oral Acute Toxicity - Up-and-Down Procedure (OECD, 2008) with adaptation from Traesel et al., (2017). Ten female rats were randomly allocated into two experimental groups (n=5): 1) negative control group, received oral treatment with 5% hydroalcoholic solution (1mL/200g of ultrapure water Milli-Q® + ethyl alcohol) and; 2) test group, administered by gavage at dose of 2000 mg/kg of Inf-L-At. Prior to gavage, each animal was identified, fasted for 8 h and weighed. In the test group, a single female was treated and monitored for symptoms of toxicity and mortality for the first 2 h and for an additional 46 h after treatment. Sequentially, after this administration and observation of the treated first female, the same dose was administered by gavage to four more females, totaling five treated animals, under the same conditions. Five females from the control group were orally treated with Inf-L-At vehicle. Animals were observed once daily for 14 days, with daily recording of water and food consumption and body weight of each animal. Subsequently, animals were analyzed according to the Hippocratic screening proposed by Malone and Robichaud (1962): conscious state; activity and motor system coordination and muscle toning; corneal and headset reflexes; activities of the central nervous system, and activities of the autonomic nervous system. Euthanasia occurred on day 15 after analyses, and animals were euthanized with isoflurane (inhalation) overdose until no corneal reflex followed by exsanguinization. Organs (heart, lung, spleen, liver, kidney, uterus and ovary) were removed, weighed and macroscopically examined for any changes. This test allowed estimating the median lethal dose (LD50).

2.6. Experimental design of treatment for toxicogenetic and immunomodulatory assessment

The experimental design of micronucleus and comet assays, and immunomodulatory effects were performed according to guidelines proposed by OECD Guidelines 474 and 489 (Organization for Economic Co-operation and Development) (OECD, 2016^a, 2016^b). Inf-L-At dosages were based on the LD50 determination (median lethal dose), which was higher than 2000 mg/kg. Treatment was performed once, and Inf-L-At was dissolved in 5% hydroalcoholic solution administered at volume of 1 mL/200g, and cyclophosphamide was dissolved in saline before administration (Araújo et al., 2017). Fifty animals were randomized into five groups (n=5 females and n=5 males). Two control groups were used, in the negative control (group I), animals received a mixture of 5% hydroalcoholic solution (Inf-L-At vehicle) by gavage (oral administration of 1 mL/200g body weight,) and saline solution (intraperitoneal administration of 0.1 mL /10 g body weight, i.p), simultaneously. Positive control (group II) was treated with gavage and received intraperitoneal cyclophosphamide at concentration of 50mg/kg body weight 24 h before euthanasia (Araújo et al., 2017). Three groups received oral Inf-L-At at doses of 62.5 (group III), 125 (group IV) or 250 (group V) mg/kg body weight for three consecutive days.

2.7. Comet assay

For the Comet assay, all steps were protected from light, by the photosensitive properties of the assay. Twenty-four hours after treatment with Inf-L-At, 20 µL of peripheral blood were collected by caudal puncture from each animal and transferred to eppendorf microtube containing 120 µL of low-melting point agarose (1.5%) at 37 °C. The homogenate produced was deposited on slides previously pre-coated with agarose (5%). After agarose

solidification (3 °C 20 min), coverslips were removed and slides were inserted in tray with final lysis solution (89.0ml lysis stock - 2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10.0mM Tris, pH 10.0 corrected with solid NaOH; 1.0ml Triton X-100 and 10.0ml DMSO) for one hour, at temperature of 4 °C, for 2 h protected from light to remove the cellular membrane and DNA extravasation. Subsequently to the denaturation process, slides were immersed in electrophoresis equipment with alkaline solution pH>13.0 (300.0 mM NaOH and 1 mM EDTA, prepared from stock solution of 10 N NaOH and 200 mM EDTA 200.0, with pH corrected to 10), remaining at rest for 20 min. After rest, they were submitted to electrophoretic run for 20 min at 4 °C and voltage set in 300 mA and 25V. Slides were exposed to neutralization solution with pH 7.5 (0.4M Tris-HCl) in three rounds of 5 min each. After this procedure, they were fixed in absolute alcohol for 10 min and dried overnight. For the analysis of slides, the staining method with 100 µL ethidium bromide (20×10^{-3} mg/mL) was used to visualize DNA fragments and were analyzed with epifluorescence microscope at 400x magnification, with 420 – 490 nm excitation filter and 520 nm barrier filter (Brait et al., 2015).

Slides were identified and examined in blind analysis and 100 cells per animal were randomly analyzed. Cells were classified as follows: class 0 (no damage); class 1 (cells with tail size smaller than nucleoid diameter); class 2 (cells with tail size 1-2 times the nucleoid diameter); and class 3 (cells with tail size greater than twice the nucleoid diameter). In addition, the damage score and frequency of each sample were calculated. The score was determined by multiplying the number of cells registered in each damage class by the numeric value of the class and summing all resulting values.

2.8. Micronucleus assay with bone marrow and peripheral blood

The micronucleus assay with peripheral blood was in accordance with Hayashi et al. (1990). A total of 20 μ L of peripheral blood were placed on slide previously covered with 20 μ L of Acridine Orange (1.0 mg/mL), and cover slip was then placed on the slide, and samples were collected in three times, at 24, 48 and 72 h (T1, T2 and T3), respectively, after Inf-L-At administration. The slide was stored in freezer for a minimum period of two weeks. The analysis was performed under epifluorescence microscope at 400x magnification, with 420 – 490 nm excitation filter and 520 nm barrier filter. Two thousand erythrocytes per animal were examined and micronucleated cells were counted (Araujo et al., 2017).

Seventy-two hours after Inf-L-At application, animals were euthanized, and the right femur was removed after dissection of adjacent muscles to conduct the micronucleus assay in bone marrow. To expose the bone marrow, the two ends of the femur were cut, and the medullary canal was washed with 1 mL of fetal bovine serum; the wash was deposited in microtubes instantly identified with alphanumeric sequence and centrifuged for 5 min at 100rpm. The resulting supernatant was discarded, the pellet was deposited on the slide, and dried overnight. After 48 h, slides were fixed in methanol for 10 min, then stained with Giemsa for 15 min.

For analysis, identification was carried out in blinded condition, a total of 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) per animal/slide were analyzed under optical microscopy with 100x magnification. For analysis of the mutagenic potential, polychromatic erythrocytes were quantified for the presence of micronucleus. To evaluate possible cytotoxic effects, the ratio between polychromatic and normochromatic erythrocytes (PCEs/NCEs) was calculated randomly analyzing 200 erythrocytes. The analysis index is

between 0 and 1, the closer to 0, the higher the cytotoxicity, the closer to 1, the lower the risk of cytotoxicity (Schmid, 1975).

2.9. Cell death assay

After euthanasia, the liver and kidneys of each animal were separated and stored in microtubes for cell death frequency analysis. Then, organs were separately macerated in 0.9% saline solution. For sample production, liver or kidneys were macerated, and 100µL of the solution was deposited under the slide for blood extension. Subsequently, slides were fixed in Carnoy for 5 min and submitted to four decreasing ethanol concentrations (95% to 25%). Subsequently, they were washed in McIlvaine buffer for 5 min, and for staining, they were submitted to 5 min to acridine orange solution (0.01%), returning to McIlvaine buffer for 10 min. Then, 100 cells per organ/animal/slide were analyzed and identified for the pattern of DNA fragmentation according to Mauro et al. (2011) and Araújo, et al. (2017).

2.10. Splenic phagocytosis assay

In this assay, a portion (1/3) of the spleen from each animal was macerated with 100 µL of saline and homogenized and a homogeneous cell suspension was obtained. To prepare the slide, 50 µL homogenate aliquot was placed under the slide, previously stained with 20 µL acridine orange (1mg/mL) and stored in freezer until analysis. This assay has quali-quantitative characteristics and 200 cells per animal were analyzed using fluorescence microscope at magnification of 400x with 420 – 490 nm filter and 520 nm barrier filter (Ishii, 2011). The absence or presence of phagocytosis was based on the description by Hayashi et al. (1990) and described by Araújo et al. (2017).

2.11. Differential blood cell

For this test, 20 μ L of peripheral blood were extracted from each animal by tail puncture. Extensor slide at 45° angle was used. After blood extension was completed, slides dried overnight and later exposed to staining with methylene blue and eosin, dissolved in methanol. During analysis, a total of 100 cells/animal was quantified under bright field microscopy at 400x magnifications, and cells were classified into lymphocytes, neutrophils, eosinophils and basophils monocytes (ISHII et al., 2011).

2.12. Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

Drosophila melanogaster mwh, ORR;*flr3* and *flr3* strains were used, carrying the following recessive markers of wing cells to identify events such as gene mutation, chromosomal aberrations and mitotic recombination: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0 ,3) and flare-3 (*flr3*, 3-38,8): [1] *multiple wing hairs strain* (*mwh*), with y genetic constitution; *mwh* jv; [2] *flare3* strain, with genetic constitution *flr3 / In* (3LR)TM3, , ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e *Bd^S*; [3] Oregon R strain, flare-3, with ORR; *flr³ / In In* (3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e *Bd^S* (Lindsley & Zimm, 1992; Graf & Van Schaik, 1992).

For the experiment, 400 virgin *flr3* females (Flare3) and ORR strains were selected, which were crossed with 200 *mwh* males for a period of 48 h, after which couples were transferred, for a period of 8 hours, to flasks containing solid agar-agar base covered by a layer of biological yeast (*S. cerevisiae*) supplemented with sugar for egg collection. After 72 \pm 4 h, third development stage larvae were washed with running water and collected with the aid of a fine mesh sieve. Groups of approximately 100 larvae were transferred to

glass tubes containing 1.5 g of culture medium (Yoki® instant squashed potato) and 5.0 mL of Inf-L-At at concentrations of 1.25, 2.5, 5.0 mg/mL, distilled H₂O as negative control ., and., 0.125 mg/mL doxorubicin hydrochloride (DXR) as positive control, using the standard cross (ST) and 0.2 mg/mL (DXR) in the high bioactivation cross (HB), and 72-h larvae were exposed to different Inf-L-At concentrations, culminating in wings with mutant spot phenotypes. The adult offspring consisted of *mwh +/+ flr³* (trans-heterozygote labeled – MH) genotypes and were collected and fixed in 70% ethanol. (30 g of arabic gum, 50 g of chloral hydrate) and analyzed for the occurrence and frequency of mutant spots in the wings of marked trans-heterozygous *D. melanogaste* descendants (*mwh/flr³*) *r* in optical microscope at 400X magnification.

2.13. Statistical analysis

For the Ames test, results were analyzed using the Salanal statistical software (US Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, USA, version 1.0, of the Research Triangle Institute, RTP, USA) and the model of Bernstein et al. (1982). For the acute toxicity test, mean ± standard deviation Student's t-test was used to compare groups. Micronucleus test, comet assay, cell death assay, Splenic phagocytosis assay, differential blood cell count data were expressed as mean ± standard error. The statistical evaluation was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test using $p < 0.05$ to consider significant differences between treatment and control groups. GraphPad Prism software was used (version 5.0; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). For the SMART test, statistical analysis of the Frei and Wrügler method was used, where findings were distinguished by the type and size of mutant stains and analyzed by bi-caudal

chi-square test for proportions, with significance level of $\alpha = \beta = 0.05$, where the statistical diagnosis was positive (+), negative (-) or inconclusive (i).

3. Results

3.1. *In vitro* Test

3.1.1. Ames Test

According to the results in Table 1, Inf-L-At did not show mutagenic potential against the TA 98 lineage without metabolic activation. However, with metabolic activation, concentrations of 150, 500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ despite not having an $\text{IM} > 2$ significantly increased ($p < 0.05$) revertant colonies, demonstrating a tendency to become mutagenic.

In relation to the TA 100 strain, Inf-L-At in the assay without metabolic activation significantly increased the number of revertant colonies at concentrations of 150, 500, 1500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, but they did not present an $\text{IM} > 2$. Also demonstrating a tendency to become mutagenic, a similar result at the concentrations of 150 and 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ of TA 100 with metabolic activation. Only concentrations of 5000; 1500 and 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ with metabolic activation had an $\text{MI} > 2$ and demonstrated to be capable of causing a base pair substitution mutation.

(INSERT TABLE 1 HERE)

3.2. *Acute toxicity test*

After oral exposure to Inf-L-At (2000mg/kg/bw) there was no record of animal mortality. During the two weeks of observation, the rats showed no changes in behavioral parameters, and no signs of clinical toxicity were shown until the last day of the Hippocratic

screening. As well as there were no significant changes in water consumption. However, the other results obtained show that for the animals exposed to Inf-L-At, there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the average feed intake per day ($82.00\text{g} \pm 6.28$), compared to the control group ($90.43\text{g} \pm 5.03$), there was also a significant decrease ($p < 0.05$) in the final average weight of the animals in the treated group ($179.40\text{g} \pm 12.12$), compared to the average weight of the animals in the control group ($200.80\text{g} \pm 13.83$).

Significant differences ($p < 0.05$) were observed in the relative weight of the kidneys and a decrease in the absolute weight of the liver of animals from the group exposed to Inf-L-At. (Table 2). After necropsy, the organs of animals in both groups did not show signs of macroscopic changes.

(INSERT TABLE 2 HERE)

3.3. Genotoxicity and Mutagenicity Studies in rodents exposed to Inf-L-At

3.3.1 Comet assay

The comet assay demonstrated a significant increase ($p < 0.0001$) in the DNA damage index (Score) in the positive control group (PC) when compared to the negative control group (NC) and to all experimental groups (62.5, 125 and 250 mg/kg). Respectively, significant differences were identified in the Score of groups treated with Inf-L-At compared to the NC group, in females exposed to a dose of 62.5 mg/kg, the Score showed a greater statistical difference ($p < 0.01$) in males, the 62.5 and 125 mg/kg doses showed Score with the greatest significant difference ($p < 0.001$) compared to the NC group. Both in the score and in the average frequency of total damage, the Inf-L-At groups were statistically different in relation to the PC group, suggesting lower damage rates in comparisons (Table 3).

(INSERT TABLE 3 HERE).

3.3.2. *Mutagenicity in bone marrow erythrocytes*

The groups of females (a) and males (b) treated with Inf-L-At at doses 62.5, 125 and 250 mg/kg showed a mutagenic tendency, the results of the mean frequency of micronuclei increased significantly ($p < 0.05$) in females and males, compared to the negative control group (NC). However, the groups treated with Inf-L-At did not show any significant difference between them. The mean micronuclei frequency values in polychromatic erythrocytes (MN-PCEs) in the cyclophosphamide (PC) group were significantly increased in both sexes. The three doses of Inf-L-At administered caused lower and significantly different damage frequencies ($p < 0.01$) compared to the mean frequencies observed in the CP group. The differences were less pronounced ($p < 0.05$) in males exposed to doses of 62.5 mg/kg and 250 mg/kg, as shown in Fig. 1.

(INSERT FIGURE 1 HERE)

3.3.3. *Cytotoxic effects on bone marrow erythrocytes*

After statistical analysis of the relationship between polychromatic and normochromatic erythrocytes (PCEs / NCEs), the results showed that treatment with doses of Inf-L-At was able to induce cytotoxicity in rats of both sexes, when compared to the negative control group statistical differences were observed ($p < 0.001$). There was a decrease in the values obtained for the ratio between (PCEs / NCEs) in the cyclophosphamide group (PC), in females (a) and males (b), these values showed a significant difference ($p < 0.001$) compared to the NC group. In summary, this observed

decrease in the ratio (PCEs / NCEs) in females and males exposed to cyclophosphamide suggest an effective cytotoxic action. However, the groups treated with Inf-L-At, despite showing a potential tendency to cytotoxicity, in comparison to the positive control group (PC) differ significantly with $p < 0.05$, suggesting a cytotoxic effect 2 times smaller than the effect of chemotherapy (Fig. 2).

(INSERT FIGURE 2 HERE)

3.3.4. Mutagenic effects on peripheral blood erythrocytes

After 24 hours of the treatment protocol, the values obtained show (mean \pm EPM) of: 5.00 ± 0.32 , 94.00 ± 1.18 , 24.00 ± 1.70 , 24.00 ± 0 , 84 and 24.60 ± 0.75 of micronucleated cells for female rats in the negative control group (NC), cyclophosphamide group (PC), groups 62.5 mg/kg, 125 mg/kg and 250 mg/kg j (Inf-L-At) respectively, and (mean \pm EPM) of 5.80 ± 0.66 , 90.60 ± 2.62 , 28.20 ± 0.49 , 25.60 ± 0.51 and 26.80 ± 1.74 , in male rats, in groups NC, PC, 62.5 mg/kg, 125 mg/kg and 250 mg/kg of the Inf-L-At. The PC group proved to be efficient in inducing damage in 24 hours (T1), 48 hours (T2) and 72 hours (T3), in animals of both sexes, and in comparison with the values recorded in the NC group, they showed differences statistics ($p < 0.001$).

The Inf-L-At showed a significant increase in the induction of mutations in the three doses administered and the mean frequency of micronucleated cells, in animals of both sexes, differed significantly ($p < 0.001$) in comparison with the negative control group (NC) in T1, T2 and T3. The groups treated with Inf-L-At showed a significant decrease in the frequency of micronuclei compared to the PC group ($p < 0.01$), therefore, the genotoxic activity observed by the administration of Inf-L-At was less efficient than the effects exhibited by cyclophosphamide (Fig. 3).

(INSERT FIGURE 3 HERE)

3.4 SMART Test

In Table 4, the results of the SMART test were represented in the frequency of single spots, large spots, twin spots, and total of mutant spots. After statistical analysis, negative control showed frequency of formation of mutant spots of 0.35 and 0.50, in ST and HB crosses, respectively. In the analysis of the positive control group (DXR), mutant spot frequency values were 3.40 in the ST cross *mwh / flr³* offspring and 5.80 in the HB cross *mwh / ORR* offspring; therefore, the DXR group showed statistical differences compared to the negative control, in both crosses, with positive diagnosis in mutagenicity. Treatment with Inf-L-At at doses of 2.5 and 5.0 mg/ml caused spot frequencies of 0.90 and 1.15, with induction potential of 61.1 and 69.56, respectively, in ST cross offspring. Furthermore, the same doses caused frequencies of 1.10 and 1.95 in HB cross offspring, with potential for inducing mutations of 54.4 and 74.35, respectively, statistically differing from negative control. According to the statistical genotoxicity diagnosis, Inf-L-At at doses 2.5 and 5.0 mg/ml caused mutagenicity; however, dose of 1.25 mg/ml showed inconclusive result, suggesting non-mutagenic potential.

(INSERT TABLE 4 HERE)

3.5. Immunomodulatory potential of animals exposed to Inf-L-At

3.5.1. Apoptotic effects on liver and kidneys

The results for the apoptosis assay were expressed as Mean \pm SEM and as the absolute total cells undergoing apoptosis in the liver and kidneys in each group. After administration of Inf-L-At at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg, significant increase ($p < 0.05$) in the frequency of cells undergoing apoptosis in the liver was observed in females, with values increased by 7.00, 5.92 and 6.36 times compared to negative control (NC). Significant increase of apoptosis in kidney cells was also observed, with average frequency of 5.27, 5.45 and 5.24 times higher than the average recorded for the NC group.

Similarly, males exposed to Inf-L-At at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg exhibited similar trend in the increase in the mean of cells undergoing apoptosis in the liver, with values of 7.46, 5.82 and 6.61 times higher than the mean values observed in the negative control group. Increase was also observed in the kidneys of these animals, whose values were 6.57, 5.12 and 5.60 times higher when compared to the mean of cells undergoing apoptosis in the kidneys of males in the NC group. The administration of cyclophosphamide in the CP group caused increase of cells undergoing apoptosis in the liver (9.63 times higher) and in the kidneys (10.86 times higher) in females, and increase of 9.97 times and 10.36 times in liver and kidneys of male animals, being statistically different ($p < 0.05$) from the negative control group (Table 5).

(INSERT TABLE 5 HERE)

3.5.2. Splenic phagocytosis in the spleen

The administration of Inf-L-At at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg showed potential in inducing splenic phagocytosis, with significant increase ($p < 0.01$) in the number of cells undergoing phagocytosis in the respective treatment groups, with average frequency

increased by 1.83, 1.48 and 1.66 times more in females and by 1.91, 1.57 and 1.76 times more in males (b), compared to animals in the negative control group (NC), with evident statistical difference ($p < 0.01$). The values shown for females (a) and males (b) in groups exposed to Inf-L-At were compared to those in the cyclophosphamide group (CP), showing statistical differences ($p < 0.01$); however, as shown in figure 4 (b), in males, the dose of 125 mg/kg Inf-L-At showed decrease in the mean number of cells in phagocytosis, significantly differing ($p < 0.05$) from the other administered doses (Fig. 4).

(INSERT FIGURE 4 HERE)

3.5.3. *Differential blood cell count*

The results obtained in the differential blood cell count showed that after the administration of Inf-L-At at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg, significant decrease ($p < 0.05$) in the mean number of lymphocytes and increase in the mean number of neutrophils were observed in treated animals compared to the negative control group. Similarly, the administration of cyclophosphamide (CP) in animals of both sexes caused significant decrease ($p < 0.05$) in the mean frequency of lymphocytes and increase in the values of circulating neutrophils. Respectively, the dose of 250 mg/kg, administered to females, and the three doses of Inf-L-At administered to males, showed ability to decrease lymphocytes and increase neutrophils; however, with significant difference compared to the CP group ($p < 0.05$). For the other types of cells, no significant differences were observed among experimental groups (Table 6).

(INSERT TABLE 6 HERE)

4. Discussion

In traditional medicine, the use of medicinal plants represents an ancient custom, being an important tool for primary health care in developing countries. Due to their wide geographic distribution or to the economic need of the population, they are preferentially used, compared to synthetic drugs (Bernstein et al., 2020). Furthermore, in economically developed nations, there has been a significant increase in the use of plant derivatives and by-products for primary health care (El Sheikha, 2017). Currently, 25% of drugs officially approved by the Food and Drug Administration (FDA) are derived from medicinal plants, and are approved by the European Medicinal Agency (EMA) for the synthesis and prospection of new semi-synthetic drugs (García-Pérez et al., 2020).

Inserted in the context of plants with wide ethnopharmacological use, the *Aristolochia triangularis* Cham. species has in its organs secondary metabolites belonging to several chemical classes, such as lignoids, terpenoids, alkaloids, alkamides and flavonoids (Silva et al., 2019). Such metabolites have therapeutic purposes for the treatment of various diseases, such as diabetes, rheumatism, infections, wounds and skin diseases, in addition to potential pharmacological actions, such as antiproliferative, antimicrobial, antiherpes and antileishmania (Oliveira et al., 2019).

Other special metabolites, such as aristolochic acids (AAs) and aristolactam, are also recurrent in species of the genus *Aristolochia*. In addition, recent publications attribute to these acids mutagenic potential and association with nephrotoxic activity, after exposure to plants of this genus (Han et al., 2019). Thus, the FDA in the United States, and other regulatory authorities in several countries have created a warning against the indiscriminate use of derivatives or parts of *Aristolochia* spp, given the risk of exposure to the respective toxins and the lack of toxicological studies. This research is encouraged by drug regulatory

agencies and represents the first study to evaluate the lyophilized infusion of *A. triangularis* leaves (Inf-L-At) by *in vitro* and *in vivo* toxicological screening, with elucidation of genotoxic and immunomodulatory effects and estimation of the safe dose for use. In folk medicine, tea from *A. triangularis* leaves is the most common form for therapeutic purposes, and thus, Inf-L-At was obtained by the infusion method, similarly to the preparation of teas, with average yield of 200 mg/kg every 1.6 liters/tea/day.

Preliminarily, Inf-L-At was evaluated by the acute toxicity test, with experimental protocol based on guideline 425 “Acute oral toxicity – Up and down procedure” from the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Female Wistar rats were preferably used, due to their greater sensitivity to toxicity tests (OECD, 2008a). In these tests, dose of 2000 mg/kg/bw of Inf-L-At was orally administered, and after observation for 14 consecutive days, no record of mortality was observed in treated rats, with estimated LD₅₀ above 2.0 g /kg. On the other hand, treatment with Inf-L-At provided significant change in the average food intake and decrease in the body weight of rats, compared to results obtained in the control group. According to Teo et al., (2002), the reduction in food intake is indicative of an adverse reaction to the drug used; in addition, it is suggested that these adverse effects may be reversible, according to evidence in longer studies, these usually occur within 30 days of exposure. Similar to results of this research, the study by Aigbe et al. (2019) exposed female rats to different doses of aqueous extract from *Aristolochia ringens* Vahl. roots, and the administration of the extract at dose of 250 mg/kg was able to cause significant reduction in the mean weight of animals. After the 4th week of exposure to the extract, significant reduction in the difference between weights of groups being compared was observed. At the same time, decrease in the absolute weight of the liver was also observed due to the attenuation of the hepatic metabolic activity in response to changes in the average food intake in the respective treatment group. Since

liver plays a central physiological role in detoxification, the consumption of medicinal plants can cause hepatotoxicity, as evidenced by macroscopic changes and increase in the absolute organ weight (Alya et al., 2015). However, this result does not suggest that oral Inf-L-At did not induce hepatotoxic alterations.

Among the other results of this test, the mean relative weight of kidneys increased significantly in rats exposed to Inf-L-At (2.0 g/kg/bw). *Aristolochia* spp. is chemically recognized for containing aristolochic acids, and in rodents, kidneys represent the main pathway for metabolizing these toxins, which with potential nephrotoxic action, are initially mediated by oxidative stress (Aigbe et al., 2019). Considering that Inf-L-At is safe for acute oral exposure in rats, at doses lower than or equal to 2000 mg/kg, its toxicological nature is classified as Class 5. As described by Traesel et al. (2014), a substance administered at 2.0 g/kg that causes no lethality nor significant changes in the Hippocratic and behavioral screening, demonstrates Class 5 toxicological nature ($LD_{50} > 2,000$ mg/kg), showing unlikely toxicity.

Animals submitted to toxicogenetic screening had their biometric parameters evaluated, and rats of both sexes maintained similarity among experimental groups. At this time, Inf-L-At did not cause clinical toxicity, without any evidence of changes in food intake, water consumption and changes in body weight or absolute weight of organs removed in laparotomy for macroscopic evaluation. Thus, the absence of toxicity in the administration of Inf-L-At doses of 62.5; 125 and 250 mg/kg in rodents was demonstrated.

Currently, regulatory agencies require medicinal plants to undergo more robust biological testing protocols for screening and monitoring of their genotoxic potential. Furthermore, genetic mutations and chromosomal abnormalities should be investigated through *in vitro* and *in vivo* assays. Among the various genotoxic study protocols, the Ames test is probably considered the main and most important mutagenicity screening, with

positive accuracy of approximately 90% in the elucidation of carcinogenic chemical substances (Zeiger, 2019). In literature, this test is also known as a reversion test or Salmonella/microsome. Sponchiado et al. (2016) suggest that this is one of the main methods for *in vitro* mutagenicity investigation. At this stage, the mutagenic potential of Inf-L-At was *in vitro* evaluated, by exposing enteric *Salmonella* TA98 and TA 100 lineages (*Salmonella Typhimurium*). Inf-L-At at concentrations of 150, 500 and 5000 µg/plate showed to significantly increase the number of TA98 revertant colonies with metabolic activation (S+), although the mutagenicity index (MI) was lower than two, indicating that, under these conditions, infusion presents mutagenic trends. Similarly, the TA 100 lineage (S-) also increased reversibility, with high proliferation in the number of colonies, once again indicating potential mutagenic trend with MI<2. However, unlike previous data, the same lineage exposed to (S+) by the microsomal fraction (S9 fraction) at concentrations of 5000; 1500 and 500 µg/plate underwent induction of DNA base pair substitution mutations, with MI > 2, thus demonstrating that the infusion has direct and/or indirect mutagenic effects only on the TA 100 lineage.

Drosophila melanogaster, popularly known as fruit fly, has 60% of the genome homologous to the human genome and 75% of genes responsible for human diseases have homologues in flies (Ugur et al., 2016). In this experimental model, phenotypically mutant spots originate from DNA lesions in imaginal disc cells that give rise to the wings of offspring exposed to the test drug. The assay detects genotoxic potential due to loss of heterozygosity, and among observable genetic alterations, punctual mutations stand out (Vasconcelos et al., 2020). From the results of the SMART test, it is reinforced that Inf-L-At at concentrations of 2.5 and 5.0 mg/ml was able to induce alterations, whether in DNA sequences, or through structural modifications in the chromosomes of the trans-heterozygote *mwh/fler*³ offspring from the standard cross (ST) and in the *mwh/TM3*

offspring from the high bioactivation cross (HB), with positive diagnosis for mutagenicity. It is known that the highest frequencies of mutant clones occurred in the ST cross offspring and in the HB cross offspring exposed to doxorubicin (DXR). This chemotherapeutic agent has intercalating action and interacts with topoisomerase II, causing permanent DNA damage. In this test, both infusion and DXR effectively caused mutagenesis in *D. melanogaster* somatic cells, probably through the formation of DNA adducts, or by inducing the formation of reactive oxygen species, with single and double strand breaks in DNA and recombinations.

To assess the genotoxic effects of Inf-L-At, the comet assay was used, which is widely used for analyzing DNA damage in eukaryotic cells and animal tissues, both *in vitro* and *in vivo*. In toxicogenetic studies, it is an efficient biomarker for detecting genotoxicity and a predictor for mutagenicity and carcinogenesis. In addition, it has consolidated methodology with simple technique and high sensitivity, statistical power and speed, with execution in less than 24 hours (Araldi et al., 2015). In this work, the alkaline version pH>13 was chosen, as recommended by guideline (TG 489) from the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

In short, Inf-L-At doses were potentially genotoxic and, compared to the control group, caused exponential increase in DNA damage, with higher frequency of cells with class 1 damage. Nevertheless, these doses did not produce damage indices (Score) as severe as those observed in animals of both sexes exposed to a single cyclophosphamide dose (CXP), considered an alkylating agent with indirect chemotherapy action in inducing DNA damage and apoptosis (Oliveira et al., 2018). Thus, it is commonly necessary to associate these results with those of other mutagenicity tests, since the comet assay does not detect mutations, but genetic lesions, which are different events: after being processed,

lesions are subject to correction by the action of DNA repair genes, otherwise, mutations occur (Ueda, 2020).

Also in this context, Inf-L-At not only caused DNA damage, but also indicated cytotoxic potential by analyzing the PCEs/NCEs ratio using micronucleus tests. In addition, Inf-L-At also showed mutagenic effects in rodents, although with less frequency of damage compared to the mutagenicity produced by the administration of cyclophosphamide in the control group. Thus, as expected, the results found in the positive control group corroborate the potential mutagenic effects attributed to the reference chemotherapy.

The action of clastogenic agents induces damage to chromosomes, or parts of them, causing nucleotide breaks and damage to genes. In parallel, aneugenic agents act specifically on the mitotic spindle, causing severe injuries. Consequently, these lesions will only attach to the DNA as micronuclei - a division after the occurrence of genetic damage that makes mutations evident (Araldi et al., 2015).

Therefore, micronucleus tests in peripheral blood and bone marrow are essential in studies such as this one, and present advantageous correlation between them, since the same animal can provide several blood samples without the need for euthanasia. The evaluation of the profile of micronucleus formation in peripheral blood occurred over the three days of exposure to Inf-L-At, and subsequently, the mutagenicity investigation was completed with the extraction of the bone marrow 72 hours after initial treatment.

The mutagenic potential described above was proven through the two tests and indicated reduction in the frequency of mutations 72 hours after the first Inf-L-At administration. As the frequency of micronuclei reduced temporally, it is likely that the organ of animals exposed to the test drug has activated apoptosis or phagocytosis pathways, similarly to results described by Araújo et al. (2017), with emphasis on the apoptotic effects

and the role of phagocytosis during the process of elimination of micronucleated cells after exposure.

This conclusion is supported by the results of cytological and immunomodulatory assays for apoptosis and phagocytosis and white blood cell count. In these assays, the diagnosis of immunomodulatory effects, including target organ apoptosis assays and splenic phagocytosis, was necessary for the better understanding of the genotoxicity mechanisms of new drugs and therapies (Oliveira et al., 2018).

At this stage, the same Inf-L-At doses that were genotoxic also stimulated splenic phagocytosis. This fact was evidenced by lymphocytopenia in the respective groups exposed to Inf-L-At, in which cells with genetic lesions were removed from the blood through efficient physiological response in the presentation of antigens to lymphocytes, triggering maturation, activation and recruitment of young cells (Araújo et al., 2017). In this case, migration of these cells to tissues was evidenced, specifically to the spleen, where they exert phagocytic activity. Furthermore, after differential count, in numerical proportion, neutrophilia occurred, which event is explained by the percentage unbalance in the decrease in total lymphocytes. Such immunomodulatory action was similar to results shown in the group exposed to CXP, initially promoting the removal of lesions, followed by removal of senescent leukocytes and apoptotic cells.

Through the apoptosis assay in kidneys and liver, it was possible to identify increased apoptotic effect on the cells of these organs in animals treated with Inf-L-At doses. This suggests that the infusion, despite being mutagenic, is exponentially efficient in activating apoptotic pathways in target organs, with potential similar to the CXP group. This event is intrinsically regulated by several molecular and biochemical factors (Saraste, 2000), controlled through the expression of anti-apoptotic proteins, such as Bcl-2, and pro-apoptotic ones, such as Bax. When exposed to mutagenic substances, cells with DNA

damage increase the synthesis and expression of these proteins and, when faced with cellular stress, a cascade of apoptotic caspases is initiated.

Through mitochondrial permeabilization, Bax protein is released in association with Bcl-2 inhibition, which enables the activation of apoptosis-associated protease activating factor (APAF-1), which binds to cytochrome c and activates caspase 9 and caspase 3 (Petros, et al., 2004). In addition, apoptosis can also be caused by specific ligands in connection with membrane receptors on tumor necrosis factors (rTNF).

When there is DNA damage, in evidence in the comet test, p53 firstly acts in an attempt to regulate the checking-point of G1 in the cell cycle. Subsequently, if the error persists, apoptotic events are activated in order to avoid the permanence of lesions after cell division and consequent induction of mutations (Desagher & Martinou, 2000). Recent *in vivo* and *in vitro* studies indicate that, in species belonging to *Aristolochia* spp., AAs induce apoptosis in kidney cells, with probable activation of apoptosis through oxidative stress, mitochondrial stress, or activation of the MAPK pathway through interaction with NADPH, in addition to other oxidative enzymes, providing suppression of the PI3K / Akt signaling pathway, with reduced Bcl-2 levels and increased Bax levels in endothelial cells (HUVECs) (Anger, et al., 2020).

There is no (complete) chemical study in literature on the chemical composition of *A. triangularis* leaves, but probably, among the various substances belonging to the organs of the species, the content of aristolochic acids I and II (AA I and AA II) will be detected and quantified, as well as lignoids, diterpenoids and phenanthrenic derivatives (Silva et al., 2019). The mutagenicity observed in Ames and SMART tests, and bone marrow and peripheral blood micronucleus assays is probably not associated with the presence of lignans discovered in recent studies, a fact that attributes to this constituent potential antimutagenic activity.

On the other hand, two essential oils extracted from *A. mollissima* rhizome and shoots indicate *in vitro* cytotoxic effects on tumor cell lineages (ACHN, Bel-7402, Hep G2 and HeLa) (Yu et al., 2007). Due to the chemical constitution mainly composed of sesquiterpenes, the analyzed cytotoxicity was correlated to them. Another study, also *in vitro*, verified cytotoxic and genotoxic effects from treatments of HepG2 cells with AA I, providing increase in the frequency of micronuclei. It is noteworthy that the identified mutagenic potential may be strongly related to the action of aristolochic acids, commonly present in *Aristolochia* spp. plant parts (Nitzsche et al., 2013).

Furthermore, kauranic diterpenes are terpenoids abundant in several *Aristolochia* species, and have several biological properties, such as abortive, anti-inflammatory, antioxidant and antityrosinase activities (Pacheco et al., 2009). In addition, they are also metabolites with potential cytotoxicity in cell lineages of prostate, colon and breast cancer (Henry et al., 2006). In general, *Aristolochia* species showed diverse patterns of cytotoxic effect mechanisms (Zhou et al. 2013).

Of all metabolites that possibly have mutagenic potential, aristolochic acids and aristolactams (ALs), abundant in the genus of the species under study and expressive in leaves, are compounds whose mutagenicity has been widely studied and recognized in literature (Han et al., 2019), being associated, for example, with nephrotoxicity in prolonged exposures in the consumption of *Aristolochia* spp. species.

The biochemical mechanism involved in the mutagenicity of AAs and ALs includes the formation of nitrogen ions from ALs and their subsequent binding to nitrogenous bases in the DNA of cells. Recent studies suggest that, after oral administration of AA in rodents, after biotransformation, metabolites are absorbed in the gastrointestinal tract, follow in the blood tissue, and act in the stomach, intestine, liver, spleen, lung and kidneys, causing DNA adducts, predictive for the identification of genotoxic and carcinogenic agents. In long-term

exposure, they cause Tp53 mutations, with activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK or MAP kinase) in association with reactive oxygen species (ROS), leading to p38 activation and causing apoptosis cascades to eliminate damages to cells (Anger et al., 2020).

In this study, from the origin of genotoxic lesions, cells did not show efficient mechanisms in relation to the activation of DNA repair genes, thus initiating mutation events. As results indicate, the frequencies of micronuclei were higher than the means of the negative control group, but lower than those recorded in the CXP control.

Furthermore, efficiency in the activation of splenic apoptosis and phagocytosis mechanisms as a strategy to eliminate damage to genetic material exposed to different treatment protocols with Inf-L-At was observed. This indicates that cells are able, in a short period of time, after acute treatments, to repair themselves without interfering with the organism's natural physiology. On the other hand, in contrary cases, when there are no efficient repair mechanisms for lesions, there is prediction of nephropathy, renal failure and carcinogenesis problems. Finally, although it is relatively premature to suggest that the mutagenic potential presented by *A. triangularis* tea is due to the presence of AAs in leaves, mainly because there is no detailed and specific chemical description for this tea in literature, recent preliminary studies on the chemical constitution of Inf-L-At corroborate this hypothesis.

5. Conclusion

In agreement with various ponderations against reductionist claims involving Aristolochia plants, this work indicated that, despite the controversy surrounding such species, the infusion to 10% of in natura *A. triangularis* leaves exhibits a pharmacological

safety profile relatively safe, as no signs of clinical or behavioral toxicity were observed by the acute toxicity test in rats. However, increasing the dose of the aqueous extract here assessed showed mutagenic effects in toxicogenetic assays, with decreased potential 72 h after treatment. Under the conditions and in the doses tested in this work, it was observed efficiency in the activation of splenic phagocytosis and cellular apoptosis, being these mechanism essential for the elimination of cells with DNA damage. Therefore, caution is required in the use of *A. triangularis* leaves for medicinal purposes, and further studies are needed in order to understand how to safely enjoy the probable health benefits of herbal preparations containing this plant.

Acknowledgements

The authors are grateful the MSc. Joelcio Freitas for botanical identification and the CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for a fellowship, thank.

Declaration of conflict od interestes

The authors declare no conflict of interest.

References

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2013. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2ª versão. Brasília.

Agência Nacional de Vigilância Sanitaria. (ANVISA). 2020. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

Aigbe, F. R., Sofidiya, O. M., James, A. B., Sowemimo, A. A., Akindere, O. K., Aliu, M. O., Dosunmua, A. A., Chijioke, M. C., Adeyemi, O. O. (2019). Evaluation of the toxicity potential of acute and sub-acute exposure to the aqueous root extract of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112150. doi:10.1016/j.jep.2019.112150

Alya, A., Ines, D. B., Montassar, L., Najoua. G., Saloua, E. F. (2015). Oxidative stress, biochemical alterations, and hyperlipidemia in female rats induced by lead chronic toxicity during puberty and post puberty periods. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18(10), pp. 1034–1043

Anger, E. E., Yu, F., & Li, J. (2020). Aristolochic Acid-Induced Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms and Potential Protective Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1157. doi:10.3390/ijms21031157

Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., de Carvalho, R. F., de Souza, E. B., de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004

Araújo, F. H. S. de, Figueiredo, D. R. de, Auharek, S. A., Pesarini, J. R., Meza, A., Gomes, R. da S., Monreal, A. C. D., Antonioli-Silva, A. C. M. B., de Lima, D. P., Kassuya, C. A. L., Beatriz, A. Oliveira, R. J. (2017). In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3), 665–675. doi:10.1590/1678-4685-gmb-20

Bernstein, N., Akram, M., Yaniv-Bachrach, Z., & Daniyal, M. (2021). Is it safe to consume traditional medicinal plants during pregnancy?. *Phytotherapy Research*, 35(4), 1908-1924. doi: 10.1002/ptr.693516-0316

Brait, D. R. H., Vaz, M. S. M., Arrigo, J. S., De Carvalho, L. N. B., De Araújo, F. H., Vani, J. M., Da Silva, M. J., Cardoso, C. A. L., Oliveira, R. J., Negrão, F. J., Kassuya, C. A. L., Arena, A. C. (2015). Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 699–705. doi:10.1016/j.yrtph.2015.10.028

Chung, Y. M., Chang, F. R., Tseng, T. F., Hwang, T. L., Chen, L. C., Wu, S. F., Lee, C. L., Lin, Z. Y., Chuang, L. Y., Su, J. H., Wu, Y. C. (2011). A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*, 21(6), 1792–1794. doi:10.1016/j.bmcl.2011.01.067

Da Silva, T., Lopes, L. M. X. (2006). Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*, 67(9), 929–937. doi:10.1016/j.phytochem.2006.02.007

Desagher, S., & Martinou, J.-C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 10(9), 369–377. doi:10.1016/s0962-8924(00)01803-1

El Sheikha, A. F. (2017). Medicinal Plants: Ethno-Uses to Biotechnology Era. *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds*, 1–38. doi:10.1007/978-3-319-53880-8_1

Frei, H., & Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4), 297-308.

Gaivão, I., Ferreira, J., & Sierra, L. M. (2020). The w/w+ Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) of *Drosophila melanogaster* for Detecting Antigenotoxic Activity. In *Genotoxicity and Mutagenicity-Mechanisms and Test Methods*. IntechOpen 21p. doi:10.5772/intechopen.91630

García-Pérez, P., Lozano-Milo, E., Landin, M., & Gallego, P. P. (2020). From Ethnomedicine to Plant Biotechnology and Machine Learning: The Valorization of the Medicinal Plant *Bryophyllum* sp. *Pharmaceuticals*, 13(12), 444. doi:10.3390/ph13120444

Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2), 153–188. doi:10.1002/em.2860060206

Graf, U., Van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, 271(1), 59–67. doi:10.1016/0165-1161(92)90032-h

Guetchueng, S. T., Nahar, L., Ritchie, K. J., Ismail, F. M., Wansi, J. D., Evans, A. R., Sarker, S. D. (2017) Kaurane diterpenes from the fruits of *Zanthoxylum lepriurii* (Rutaceae). *Records of Natural Products*, 11 (3). pp. 304-309. ISSN 1307-6167

Han, J., Xian, Z., Zhang, Y., Liu, J., & Liang, A. (2019). Systematic Overview of Aristolochic Acids: Nephrotoxicity, Carcinogenicity, and Underlying Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi:10.3389/fphar.2019.00648

Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr, M. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245(4):245-9. doi: 10.1016/0165-7992(90)90153-b

Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M. S. J. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources, 125(1), 0–144. doi:10.1016/j.jep.2009.05.028

Henry, G.E.; Adams, L.S.; Rosales, J.C.; Jacobs, H.; Heber, D.; Seeram, N.P. Kaurene diterpenes from *Laetia thamnina* inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* 2006, 244, 190-194.

Ishij, P. L., Prado, C. K., Mauro, M. O., Carreira, C. M., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Dichi, J. B., Oliveira, R. J. (2011). Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. 59(3), 412–422. doi:10.1016/j.yrtph.2011.01.004

Kumar, V., Poonam, Prasad, A. K., Parmar, V. S. (2003). Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Natural Product Reports*, 20(6), 565–. doi:10.1039/b303648k

Leitão, G. G., Menezes, D. L. F. S., Kaplan, M. A. C., Craveiro, A. A., Alencar, J. W. (1991). Essential Oils from Brazilian *Aristolochia*. *Journal of Essential Oil Research*, 3(6), 403–408. doi:10.1080/10412905.1991.9697974

- León-Díaz, R., Meckes-Fischer, M., Valdovinos-Martínez, L., Campos, M. G., Hernández-Pando, R., Jiménez-Arellanes, M. A. (2013). Antitubercular Activity and the Subacute Toxicity of (–)-Licarin A in BALB/c Mice: A Neolignan Isolated from *Aristolochia taliscana*. *Archives of Medical Research*, 44(2), 99–104. doi:10.1016/j.arcmed.2012.12.006
- Lin, W. H., Fu, H. Z., Hano, Y., Nomura, T. (1997). Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (L), 6 (1), 8-13.
- Lindsley, D. L., & Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*, 1133.
- Lopes, L. M. X., Bolzani, V. S., Trevisan, L. M. V., Grigolli, T. M. (1990). Terpenes from *Aristolochia triangularis*, 29(2), 660–662. doi:10.1016/0031-9422(90)85139-7
- Mauro, M. O., Sartori, D., Oliveira, R. J., Ishii, P. L., Mantovani, M. S., & Ribeiro, L. R. (2011). Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 715(1-2), 7–12. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.06.015
- Michl, J., Kite, G. C., Wanke, S., Zierau, O., Vollmer, G., Neinhuis, C., Simmonds, M. S. J., Heinrich, M. (2015). LC-MS- and ¹H NMR-Based Metabolomic Analysis and in Vitro Toxicological Assessment of 43 *Aristolochia* Species. *Journal of Natural Products*, doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00556
- Mirzoyan, Z., Sollazzo M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., Bellosta P. (2019) *Drosophila melanogaster*: a model organism to study cancer. *Front. Genet.* 10:51. doi:10.3389/fgene.2019.00051
- Mortelmans, M., Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. , 455(1-2), 29–60. doi:10.1016/s0027-5107(00)00064-6

Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, (), -. doi:10.1038/s41575-018-0005-x

Nitzsche, D., Melzig, M. F., Arlt, V. M. (2013). Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I – A component of Aristolochiaceae plant extracts used in homeopathy. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(2), 325–334. doi:10.1016/j.etap.2013.01.007

Nogueira, C. R., Lopes, L. M. X. (2012). Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*. *Química Nova*, 35(4), 780–782. doi:10.1590/s0100-40422012000400

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1997. Guideline for The Testing of Chemicals. TG 741: Bacterial Reverse Mutation Test. Paris, France.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2008 Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049_en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2016. Guideline for the testing of chemicals. No 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Paris, 2016a.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2016. Guideline for the testing of chemicals. No 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test Paris, 2016b

Oliveira, S. Q., Kratz, J. M., Chaves, V. C., Guimarães, T. R., Costa, D. T. M., Dimitrakoudi, S., Vontzalidou, A., Bordignon, S. A. L., Simionato, C. P., Steindel, M., Reginatto, F. H.,

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P. (2019). Chemical Constituents and Pharmacology properties of *Aristolochia triangularis*: a south brazilian highly-consumed botanical with multiple bioactivities. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3). doi:10.1590/0001-3765201920180621

Pacheco, A. G., Oliveira, P. M., Dorila, P. V., Alcântara, A. F. C. (2009). ¹³C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species. *Molecules*, 14(3), 1245–1262. doi:10.3390/molecules14031245

Pereira, A. O., Avila, J. M., do Carmo, G., Siqueira, F. S., Campos, M. M. A., Back, D. F., Morel, A. F., Dalcol, I. I. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. *Industrial Crops and Products*, 121(), 461–467. doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.052

Pereira, J. L., Sampaio e Souza, P. C., Shinzato, V. I., Sasso, S., Santo, B. L. S. do E., Santana, L. F., Restel, T. I., Freitas, K. D. C. (2018). Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. *Ciência & Saúde*, 11(1), 51. doi:10.15448/1983-652x.2018.1.27672

Petros, A. M., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1644(2-3), 83–94. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.012

Priestap, H. A., Bandoni, A. L., Neugebauer, M., Rücker, G. (1990). Investigation of the Essential Oils from *Aristolochia triangularis*. *Journal of Essential Oil Research*, 2(3), 95–98. doi:10.1080/10412905.1990.9697836

Reis, A. F., & Schmiele, M. (2019). Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. doi: 10.1590/1981-6723.15017

Rücker, G., Langmann, B. (1978). 3,4-Dimethoxy-3,4-desmethylenedioxy-cubebin, a new lignan from *Aristolochia triangularis*, 19(5), 457–458. doi:10.1016/s0040-4039(01)91453-4

Rücker, G., Langmann, B., de Siqueira, N. (1981). Constituents of *Aristolochia triangularis*. *Planta Medica*, 41(2), 143–149. doi:10.1055/s-2007-971691

Saraste, A. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537. doi:10.1016/s0008-6363(99)00384-3

Schmid, W. (1975) The micronucleus test. *Mutation Research*, Amsterdam, 31 (1), 9-15.

Sharma, P., Manchanda, R., Goswami, R., & Chawla, S. (2019). Biodiversity and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. *Environmental Concerns and Sustainable Development*, 27–44. doi:10.1007/978-981-13-6358-0_2

Silva, J. D. A. D., Nogueira, C. R., Vieira, M. D. C., Heredia-Vieira, S. C., Barufatti, A., Crispim, B. D. A., Francisco, L. F. V., Viana, L. F., Cardoso, C. A. L. (2019). Toxicological properties of an aqueous extract of *Aristolochia triangularis* leaves, using the brine shrimp lethality and *Allium cepa* bioassays. *Ciência Rural*, 49(8). doi:10.1590/0103-8478cr20190091.

Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Silva Soley, B., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., Correr, C. J., Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289–296. doi:10.1016/j.jep.2015.10.026

Tempone, A. G., Sartorelli, P., Teixeira, D., Prado, F. O., Calixto, I. A. R. L., Lorenzi, H., Melhem, M. S. C. (2008). Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(5), 443–449. doi:10.1590/S0074-02762008000500006

Traesel, G. K., Araújo, F. H. S., Castro, L. H. A., De Lima, F. F., Menegati, S. E. L. T., Justi, P. N., Kassuya, C. A. L., Cardoso, C. A. L., Argandoña, E. J. S., Oesterreich, S. A. (2017). Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. *Journal of Medicinal Food*, (), jmf.2017.0021–. doi:10.1089/jmf.2017.0021

Traesel, G. K., de Souza, J. C., de Barros, A. L., Souza, M. A., Schmitz, W. O., Muzzi, R. M., Oesterreich, S. A., Arena, A. C. (2014). Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 320–325. doi:10.1016/j.fct.2014.10.026

Ueda, M. (2020). Alkali Comet Assay in Genotoxicity Tests. In: *DNA Electrophoresis Methods in Molecular Biology* (pp. 73-78). Humana, New York, NY. doi:10.1007/978-1-0716-0323-9.

Ugur, B., Chen, K., Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease models & mechanisms*, 9(3), 235-244.

Vasconcelos, M. A., Orsolin, P. C., Oliveira, V. C., Lima, P. M. A. P., Naves, M. P. C., de Moraes, C. R., Nicolau-Júnior, N., Bonetti, A. M., Spanó, M. A. (2020). Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and in silico studies. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111549. doi:10.1016/j.fct.2020.111549.

Wu, T. S., Damu, A. G., Su, C. R., Kuo, P. C. (2004). Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Natural Product Reports*, 21(5), 594–. doi:10.1039/B401950D

Wu, J., & Waxman, D. J. (2018). Immunogenic chemotherapy: Dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Letters*, 419, 210–221. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.050

Yu, J. Q., Liao, Z. X., Cai, X. Q., Lei, J. C., & Zou, G. L. (2007). Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(2), 162–167. doi:10.1016/j.etap.2006.08.004

Zeiger, E. (2019). The Test that Changed the World: The Ames Test and the Regulation of Chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. doi:10.1016/j.mrgentox.2019.05.007

Zhou, Z. B., Luo, J. G., Pan, K., Shan, S. M., Zhang, W., & Kong, L. Y. (2013). Bioactive benzofuran neolignans from *Aristolochia fordiana*. *Planta medica*, 79(18), 1730-1735. doi: 10.1055/s-0033-1351100

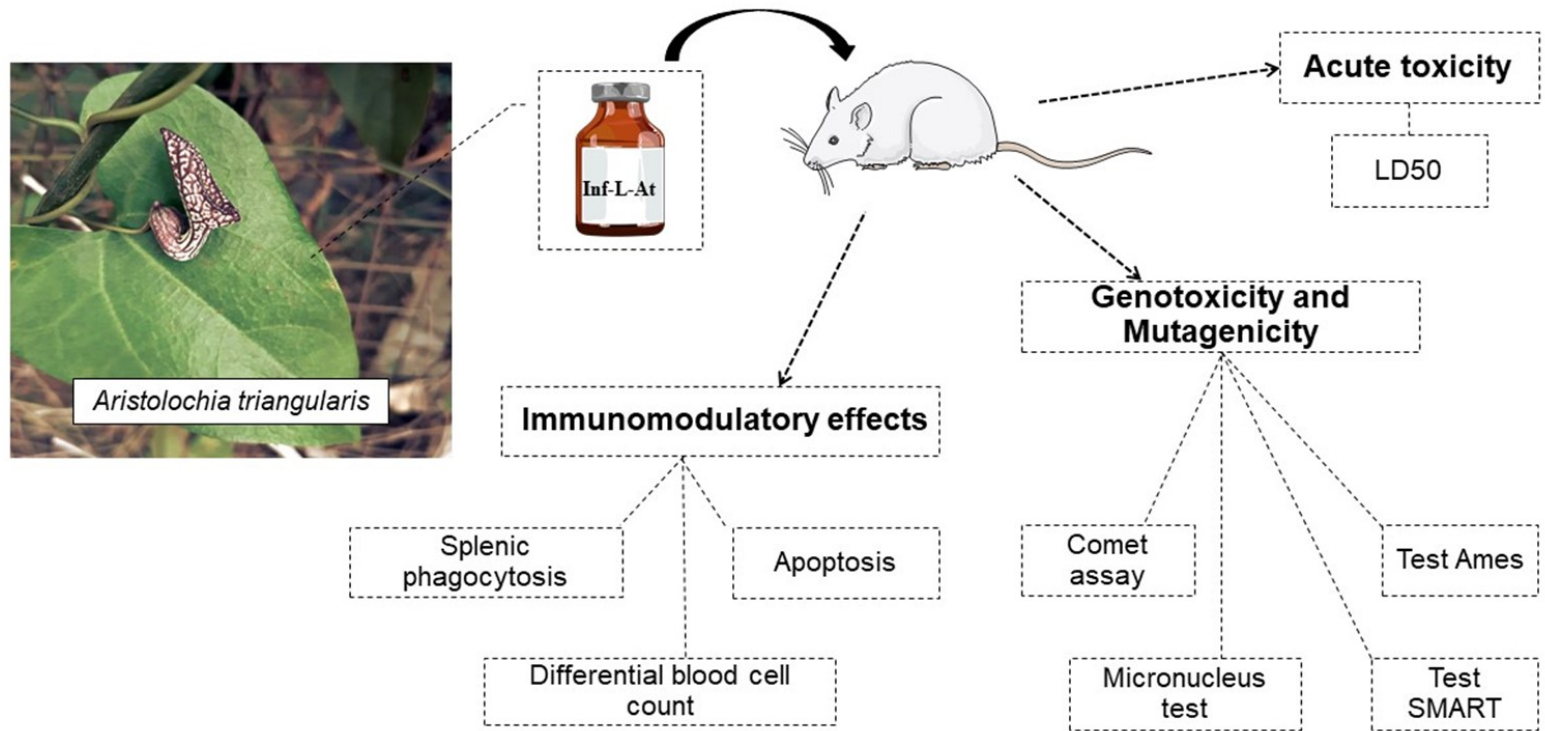
Ethnopharmacological relevance - scarcity of toxicological information

Fig.1

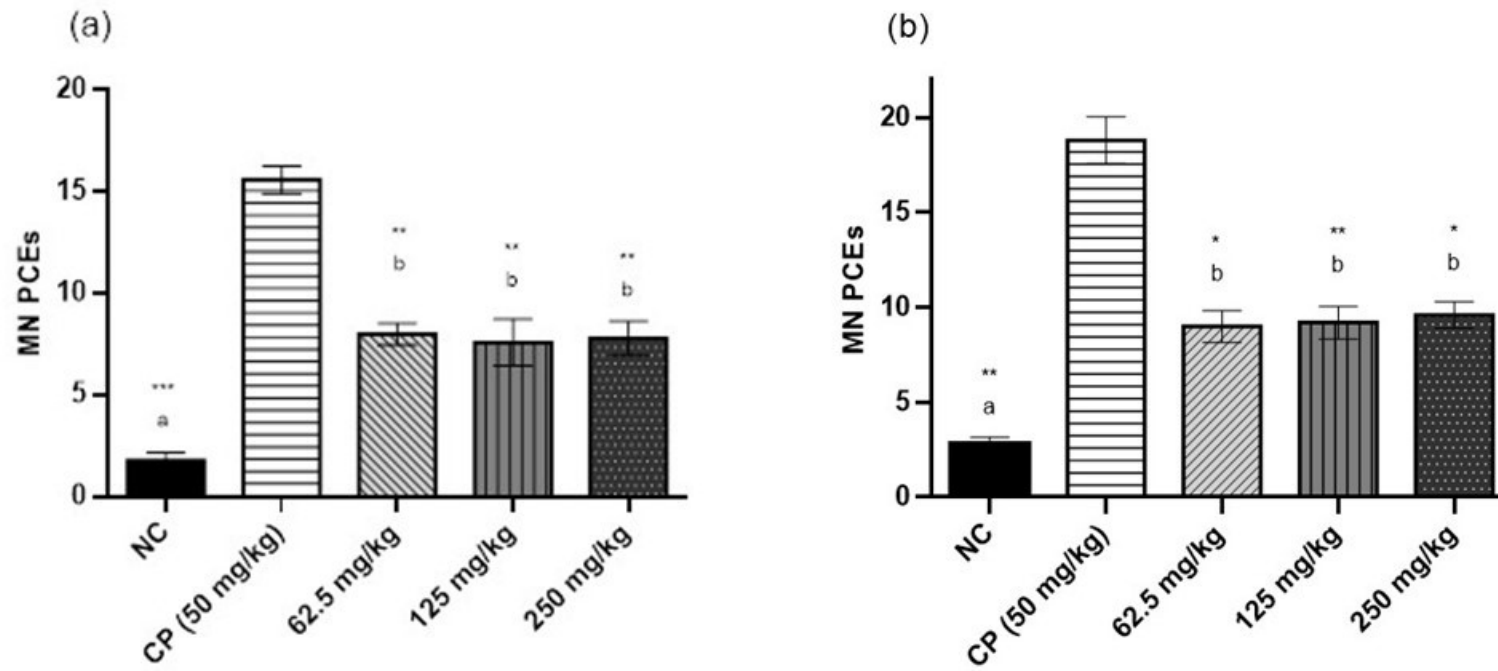


Fig.2

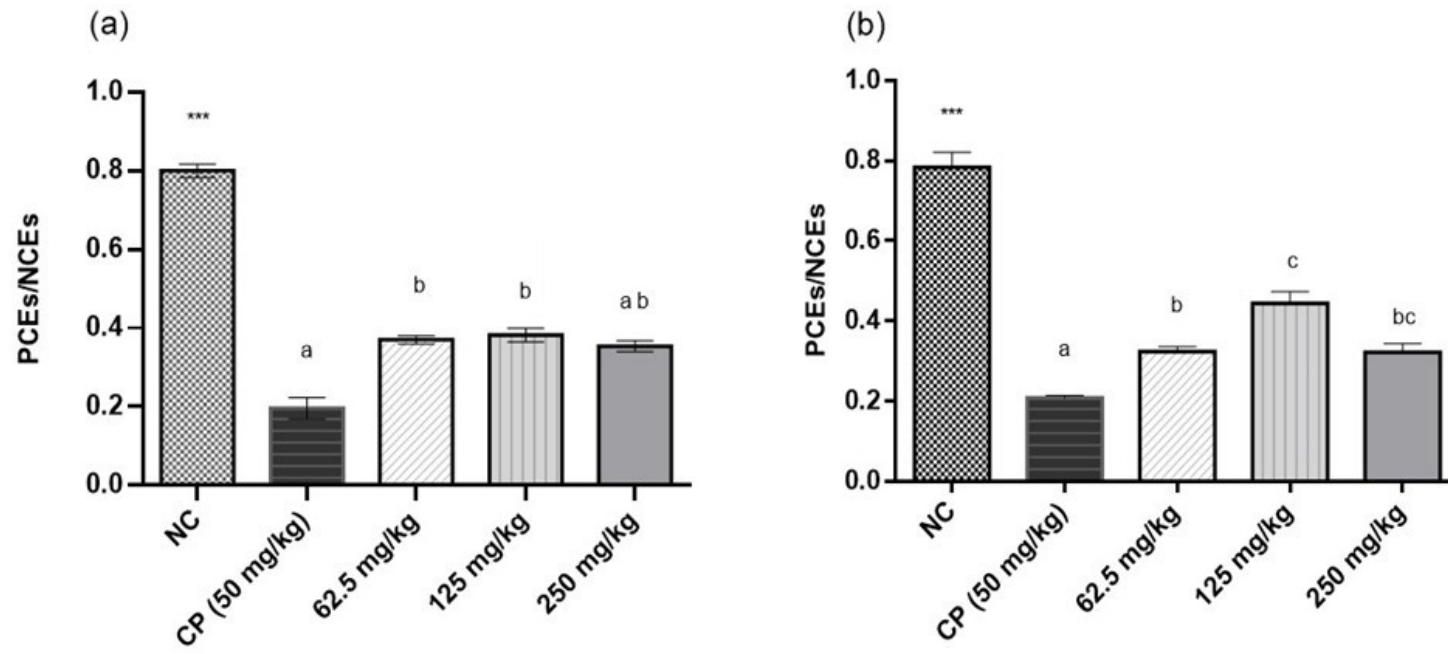


Fig.3

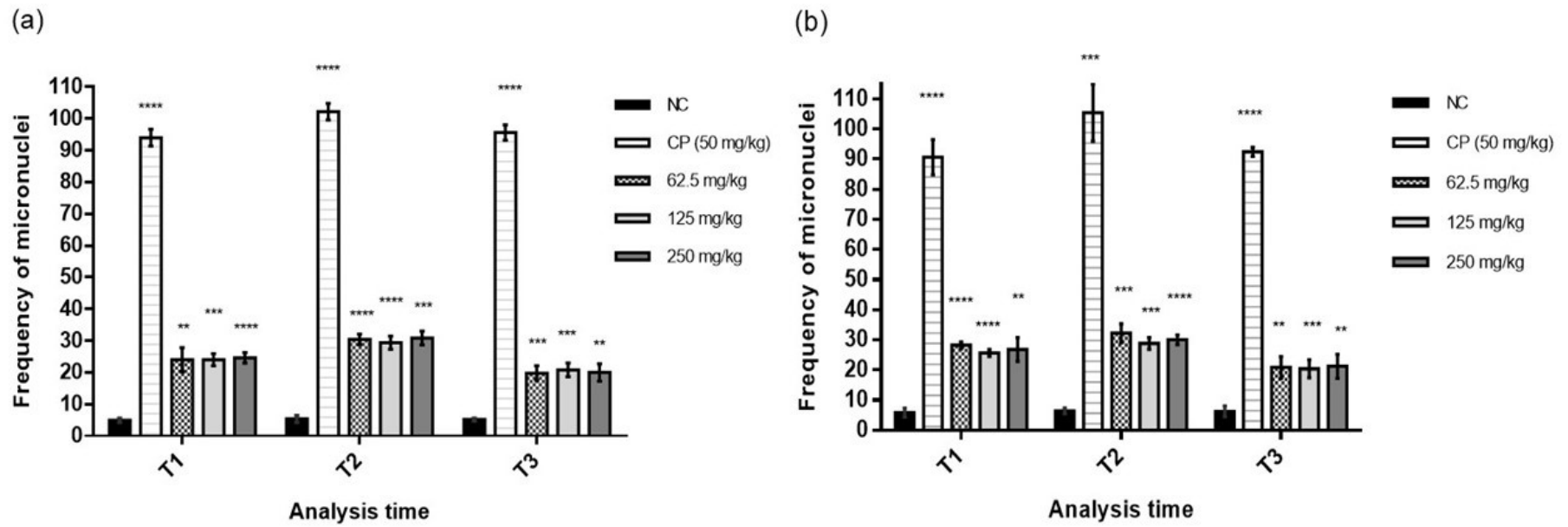


Fig.4

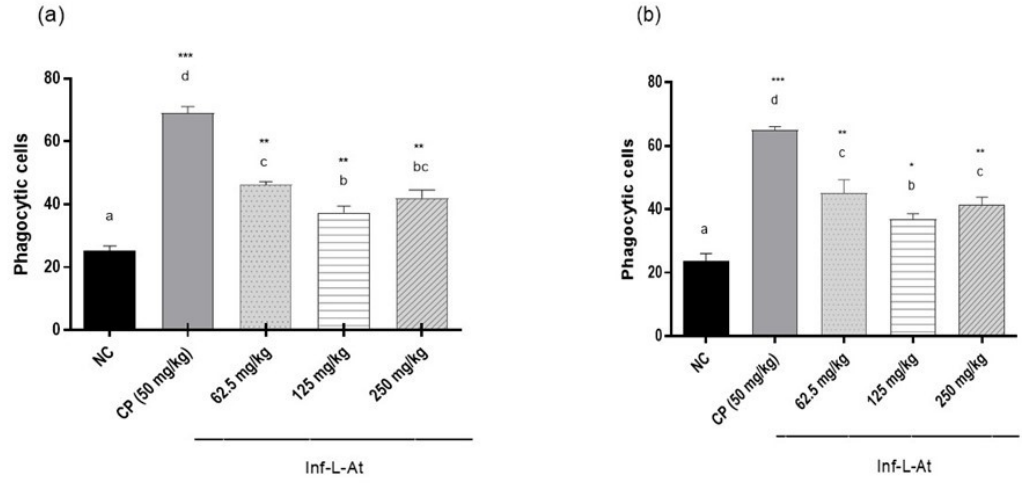


Figure Captions

Fig. 1. Mutagenic effects after treatment with Inf-L-At and cyclophosphamide (CP) in MN-PCEs counts using the bone marrow of female (a) and male (b) Wistar rats. Data expressed as mean \pm SEM (n = 5) of the number of MN-PCEs in the micronucleus assay. Differs from the (CP) *** p <0.001; ** p <0.01; * p <0.05; Different letters indicate statistically significant differences between group p <0.05 (one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test). A total of 2000 polychromatic erythrocytes from each animal were analyzed. MN-PCEs were quantified.

Fig. 2. Cytotoxic effects of treatment with Inf-L-At and cyclophosphamide (CP) in the PCEs/NCEs ratio the bone marrow of female (a) and male (b) Wistar rats. Data expressed as mean \pm SEM (n = 5) of the PCEs/NCEs ratio in the micronucleus assay. *** Negative control (NC) differs significantly (CP) and from other groups p <0.001. Different letters indicate statistically significant differences p <0.05 (one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test). A total of 200 cells from each animal were analyzed.

Fig. 3. Frequency of micronuclei in female (a) and male (b) rats treated orally with Inf-L-At cyclophosphamide. Analysis of variance - One-Way ANOVA with Tukey's post-test. ****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01 compared to the control group. Bars represent groups in time 24 hours (T1), 48 hours (T2) and 72 hours (T3) after the treatment.

Fig. 4. Cells with evidence of phagocytosis 72 hours after treatment with Inf-L- At (2.5; 125 e 250 mg/kg) and cyclophosphamide (CP 50 mg/kg), female (a)and male (b) Wistar rats. Data expressed as mean \pm SEM (n = 5) differs significantly from groups control ***p <0.001; ** p <0.01; *p <0.05. Different letters indicate statistically significant differences in comparisons between groups p <0.05 (one- way ANOVA, followed by Tukey's post-test). A total of 200 cells from each animal were analyzed.

Table

✱

Table 1. Mutagenic activity expressed as the mean of revertants/plate \pm standard deviation of the lyophilized infuse of *Aristolochia triangularis* leaves against *S.*

Concentrações ($\mu\text{g/placa}$)	TA 98		TA 100	
	S+	S-	S+	S-
0 ^a	12.00 \pm 3.61	27.33 \pm 1.53	86.00 \pm 5.29	85.67 \pm 15.82
50	20.00 \pm 4.58	19.33 \pm 2.08	170.67 \pm 1.53**	158.67 \pm 35.80
150	21.33 \pm 1.53*	19.67 \pm 2.08	140.00 \pm 10.39**	167.33 \pm 5.86**
500	23.00 \pm 3.00*	24.33 \pm 2.89	226.67 \pm 4.62**	138.33 \pm 15.04*
1500	16.00 \pm 5.20	21.33 \pm 7.77	173.00 \pm 4.58**	170.67 \pm 2.52**
5000	23.67 \pm 1.53*	24.67 \pm 5.69	282.00 \pm 25.06**	158.33 \pm 15.01*
C+	307 \pm 9.00 ^d	820.50 \pm 3.50 ^b	1317.00 \pm 1.00 ^d	1328.50 \pm 31.50 ^c

Typhimurium TA 98 and TA 100 lineages with metabolic activation (S+) and without metabolic activation (S-).

0^a: Distilled water used as extract diluent; Positive Control (C +); ^b 4-nitro-o-phenylenediamine (10 $\mu\text{g/plate}$);
^c Sodium azide (2.5 $\mu\text{g/plate}$); ^d2AA-aminoanthracene (2.5 $\mu\text{g/plate}$).
 Significant difference ANOVA: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 2. Food and water intake, body weight gain, absolute and relative organ weight (g /100g body weight) of rats treated orally for 14 days in acute toxicity with lyophilized infuse of *Aristolochia triangularis* leaves

Acute Toxicity		
Parameters	Control	2000 mg.kg⁻¹
Initial weight (g)	179.80 ± 10.69	161.40 ± 9.99
Final weight (g)	200.80 ± 13.83	179.40 ± 12.12*
Body weight gain (%)	11.68 ± 1.62	11.15 ± 3.50
Food intake (g/day)	90.43 ± 5.03	82.00 ± 6.28*
Water intake (mL/day)	207.69 ± 39.24	187.31 ± 42.06
Organs (g)		
Organs (g.100g⁻¹)		
Heart (g)	0.58 ± 0.08	0.54 ± 0.10
Heart (g /100g)	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.05
Lung (g)	0.96 ± 0.17	0.85 ± 0.10
Lung (g /100g)	0.47 ± 0.06	0.47 ± 0.06
Liver (g)	9.05 ± 0.64	7.67 ± 0.43**
Liver (g /100g)	4.51 ± 0.29	4.28 ± 0.17
Kidney (g)	0.76 ± 0.08	0.72 ± 0.06
Kidney (g /100g)	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.01*
Spleen (g)	0.39 ± 0.05	0.37 ± 0.05
Spleen (g /100g)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02
Ovary (g)	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.02
Ovary (g /100g)	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01
Uterus (g)	0.53 ± 0.23	0.42 ± 0.19
Uterus (g /100g)	0.27 ± 0.13	0.23 ± 0.11

Values expressed in mean ± standard deviation. n = 5 animals / group. Values differ statistically from the control group (t student) * p <0.05.

Table 3. Effects of treatment with Inf-L-At and cyclophosphamide (positive control) on the index and frequency DNA damage using the peripheral blood of female and male *Wistar* rats.

Groups	Injured Cells	Classes of damage				Score
		0	1	2	3	
Female						
NC						
CP	5.00±1.51	95.00±1.51 ^a	4.60±1.29 ^a	0.40±0.40 ^a	0.00±0.00 ^a	5.40±1.80
62.5 mg/kg	65.00 ±1.14 ^{***}	35.00±1.14 ^c	35.20±1.77 ^c	25.60±0.75 ^c	4.20±0.37 ^b	99.00 ±0.84 ^{****}
125 mg/kg	27.00±2.05 ^{**}	73.00±2.05 ^b	23.40±1.72 ^b	2.40±0.24 ^b	1.20±0.37 ^a	31.80±2.74 ^{**}
250 mg/kg	24.80±2.48 ^{**}	75.20±2.48 ^b	21.80±1.93 ^b	2.20±0.37 ^{ab}	0.80±0.58 ^a	28.60±3.47 [*]
	24.60±2.11 ^{**}	75.40±2.11 ^b	21.20±1.93 ^b	2.20±0.37 ^{ab}	1.20±0.20 ^a	29.20±2.46 [*]
Male						
NC						
CP	6.20±0.80	93.80±0.80 ^a	5.40±0.87 ^a	0.60±0.40 ^a	0.20±0.20 ^a	7.20±1.02
62.5 mg/kg	64.00 ±2.43 ^{***}	36.00±1.87 ^c	35.80±2.89 ^c	25.00±0.95 ^b	3.20±0.80 ^c	95.40 ±3.47 ^{***}
125 mg/kg	28.80±1.62 ^{***}	71.20±1.62 ^b	25.80±1.59 ^b	2.20±0.73 ^a	0.70±0.37 ^b	32.60±1.72 ^{***}
250 mg/kg	28.60±1.25 ^{***}	71.40±1.25 ^b	26.20±1.16 ^b	1.40±0.40 ^a	1.00±0.45 ^b	32.00±1.30 ^{***}
	24.20±1.56 ^{***}	75.80±1.56 ^b	21.40±1.57 ^b	1.60±0.51 ^a	1.20±0.49 ^{abc}	28.20±2.13 ^{**}

Negative control – (NC) saline solution; Cyclophosphamide 50 mg/kg bw. (CP), ip.; Inf-L-At leaves (62.5; 125 e 250 mg/kg). Values expressed as mean ± SEM, n = 5 animals/group. ^a no genotoxic; others letter show genotoxic potential, show statistically significant differences (p < 0.05) compared to each other ANOVA/Tukey. Analysis of variance - One-Way ANOVA with Tukey's posterior test. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001 compared to the NC. group. Class 0: no damage; class 1: tail of comet shorter than the diameter of nucleoid; class 2: tail of comet once or twice the diameter of nucleoid; class 3 e tail of comet more than twice the diameter of nucleoid.

Table 4. Frequency of mutant spots in the wings of marked trans-heterozygous descendants (*mwh/flr³*) of *D. melanogaster* using the standard cross (ST) and cross the high bioactivation (HB) after chronic treatment of larvae with Inf-L-At (Infuso liofilizado de *Aristolochia triangulares*).

Genotypes and Conc. (mg/mL)	N° of flies (N)	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Total Spots	Total clones <i>mwh</i> ^c	Induction (%)		
		Small single spots (1-2 céls) ^b		Large single spots (>2céls) ^b						
(ST)		m = 2		m = 5		m = 2	(n)			
NC	20	0.30	(06)	0.05	(01)	0.35	(07)	07		
DXR (0.125)	20	0.60	(12)	1.90	(38)	3.40	(68) +	67		
Inf-L-At (1.25)	20	0.50	(10) i	0.10	(02) i	0.65	(13) i	13		
Inf-L-At (2.5)	20	0.70	(14) i	0.20	(04) i	0.90	(18) +	18	61,1	
Inf-L-At (5.0)	20	0.50	(10) i	0.45	(09) +	1.15	(23) +	23	69,56	
(HB)										
NC	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.5	(10)	10		
DXR (0.2)	20	1.45	(29) +	2.80	(56) +	5.80	(116) +	114		
Inf-L-At (1.25)	20	0.70	(14) i	0.20	(04) i	0.90	(18) i	18		
Inf-L-At (2.5)	20	0.80	(16) +	0.20	(04) i	1.10	(22) +	22	54,54	
Inf-L-At (5.0)	20	0.85	(17) +	0.85	(17) -	1.95	(39) +	39	74,35	

^a Statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive. m, multiplication factor for the evaluation of significantly negative results. Significance levels $p < 0.05$. ^b Including rare *flr3* single spots. ^c Considering *mwh* clones for single *mwh* spots and for twin spots. ^d Only single *mwh* spots can be observed in heterozygous *mwh/TM3* individuals, as the TM3 chromosome does not contain the *flr3* mutant gene. I% = $(T-NC)/T \times 100$, where T=treatment (infusion); NC+ negative control.

Table 5. Mean \pm standard error of apoptotic cells in liver and kidney of rats treated with different doses of Inf-L-At.

Groups	Liver			Kidneys	
	Total cells analyzed	Apoptotic cells	Mean \pm SE	Apoptotic cells	Mean \pm SE
female					
NC	1000	41	8.20 \pm 0.80 ^a	29	5.80 \pm 0.58 ^a
CP 50 mg/kg	1000	395	79.00 \pm 4.40 ^c	315	63.00 \pm 3.69 ^c
Inf-L-At 62.5 mg/kg	1000	287	57.40 \pm 1.78 ^b	153	30.60 \pm 1.21 ^b
Inf-L-At 125 mg/kg	1000	243	48.60 \pm 2.64 ^b	158	31.60 \pm 1.40 ^b
Inf-L-At 250 mg/kg	1000	261	52.20 \pm 1.59 ^b	152	30.40 \pm 0.93 ^b
male					
NC	1000	39	7.80 \pm 1.32 ^a	126	6.60 \pm 0.93 ^a
CP 50 mg/kg	1000	389	77.80 \pm 2.94 ^d	345	68.40 \pm 3.04 ^c
Inf-L-At 62.5 mg/kg	1000	291	58.20 \pm 3.02 ^c	231	43.40 \pm 2.22 ^b
Inf-L-At 125 mg/kg	1000	227	45.40 \pm 2.69 ^b	187	33.80 \pm 1.83 ^b
Inf-L-At 250 mg/kg	1000	258	51.60 \pm 2.69 ^{bc}	210	37.00 \pm 3.83 ^b

NC (Negative Control) – 1 mL of saline solution orally applied + Cyclophosphamide vehicle, intraperitoneally applied. CP (Cyclophosphamide) - 50 mg/kg b.w., intraperitoneally applied.; Inf-L-At (Lyophilized *Aristolochia triangularis* Infusion) at doses of 62.5; 125 and 250 mg/kg b.w, orally applied. Different letters indicate statistically significant differences. ANOVA Test, ($p < 0.05$; Tukey

Table 6. Differential count of peripheral blood cells in Wistar rats exposed to treatment with Inf-L-At.

Cells	Lymphocytes	Neutrophils	Monocytes	Eosinophils	Basophils
Reference values	40-92%	6-49%	0,6-9%	0-3%	0-2%
female					
NC	64.60±1.21 ^c	33.00±1.38 ^a	2.00±0.55 ^a	0.40±0.24 ^b	0.00±0.00 ^a
(CP)	39.20 ±1.35 ^a	59.80±1.16 ^c	0.40±0.24 ^a	0.60±0.24 ^a	0.00±0.00 ^a
Inf-L-At 62.5 mg/kg	43.00±1.87 ^{ab}	55.00±1.67 ^{bc}	0.80±0.49 ^a	1.20±0.20 ^a	0.00±0.00 ^a
Inf-L-At 125 mg/kg	42.00±1.14 ^{ab}	55.40±1.60 ^{bc}	1.20±0.58 ^a	1.40±0.51 ^a	0.00±0.00 ^a
Inf-L-At 250 mg/kg	47.20±2.41 ^b	50.20±2.27 ^b	1.60±0.98 ^a	1.00±0.63 ^a	0.00±0.00 ^a
males					
NC	70.20±1.07 ^c	27.40±1.16 ^a	2.20±0.20 ^a	0.20±0.20 ^a	0.00±0.00 ^a
(CP)	38.20±1.71 ^a	59.60±2.09 ^c	0.60±0.40 ^a	1.60±0.24 ^a	0.00±0.00 ^a
Inf-L-At 62.5 mg/kg	52.40±2.13 ^b	45.80±1.85 ^b	0.80±0.49 ^a	1.41±0.63 ^a	0.00±0.00 ^a
Inf-L-At 125 mg/kg	51.60±1.89 ^b	46.20±1.46 ^b	1.40±0.60 ^a	1.09±0.49 ^a	0.00±0.00 ^a
Inf-L-At 250 mg/kg	51.80±1.93 ^b	46.60±2.42 ^b	1.00±0.63 ^a	0.55±0.25 ^a	0.00±0.00 ^a

Reference values, mean ± standard error for each blood cell type. NC (Negative Control) – 1 mL saline solution orally applied + Cyclophosphamide vehicle, intraperitoneally applied. CP (Cyclophosphamide) - 50 mg/kg b.w., intraperitoneally applied; Inf-L-At (Lyophilized *Aristolochia triangularis* infusion) at doses of 62.5; 125 and 250 mg/kg b.w, orally applied. Different letters indicate statistically significant differences. ANOVA Test, (p<0.05; Tukey).

6.3. Artigo III: Antihiperglicemic potential and chemical constituents of *Aristolochia triangularis* (Cham.) leaves

Artigo nas normas do Journal of Ethnopharmacology. Fator de Impacto 4.36. Qualis A2 em Medicina II.

Data da Submissão: xx/xx/2021.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

**Antihyperglycemic potential and chemical constituents of *Aristolochia triangularis*
(Cham.) leaves**

Flávio Henrique Souza de Araújo^a, Cláudio Rodrigo Nogueira^{b*}, Virginia Demarchi Kappel Trichez^a, Silvia Aparecida Oesterreich^a

^a*Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: flaviobiosmart@gmail.com, virginiaakappel@ufgd.edu.br; silviaoesterreich@gmail.com; Phone: +55 (67) 3410-2001*

^b*Faculty of Exact Sciences and Technology (FACET), Federal University of Grande Dourados – UFGD, 79.804-970, Dourados, MS, Brazil. E-mail: claudiornogueira@ufgd.edu.br; Phone: + 55 (67) 3410-2081*

Authors' contributions

Flávio Henrique Souza de Araújo^a, Virginia Demarchi Kappel Trichez^a Silvia Aparecida Oesterreich^a, Responsible for conducting the experiments, administration of the treatments in the rats, maintenance of the animals, organization of the experiments and statistical analysis

Cláudio Rodrigo Nogueira^b, Responsible for with development of infusion preparation, and phytochemical characterization.

All authors contributed to the writing and review of the article.

***Authors to whom correspondence should be addressed**

Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados. Rodovia Dourados – Itahum, Km 12. Mato Grosso do Sul, Brazil. Tel. number : +55-67-3410-2001, E-mail addresses flaviobiosmart@gmail.com

¹Abbreviations

¹Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; AMPK: adenosine monophosphate activated protein kinase; CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais; DM2: diabetes melito tipo 2; EtOH:; GI: grupo controle negativo; GII: grupo controle positivo (glibenclamida 100 mg/kg v.o); GIII: grupo tratado com o Inf-L-At (62.5 mg/kg); GIV: grupo tratado com o Inf-L-At (125 mg/kg); GV: grupo tratado com o Inf-L-At (250 mg/kg); GLU: glicose; GLUT: glucose transporter; GOD: glicose oxidase; HbA1c: hemoglobina glicada; Inf-L-At: freeze-dried infusion from *Aristolochia triangularis* leaves; K_{ATP} : Potássio sensível ao ATP; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; OGTT: Teste Oral de Tolerância à Glicose; PI3K Phosphoinositide 3-kinases; SUR: Receptor de sulfonilureias; SGLT1: glucose transporter-1 linked to sodium ions; SGLT2: glucose transporter-2 linked to sodium ions; STZ: streptozotocin.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Aristolochia triangularis* has been extensively used in the Brazilian popular medicine for various therapeutic purposes, presenting leaf-based teas indication mainly to manage diabetes. *Aim of the study:* This study was designed to chemically characterize an infusion of *in natura* leaves of *A. triangularis*, as well as evaluate its *in vivo* antihyperglycemic properties.. *Materials and methods:* Chemical composition was examined using liquid-liquid extraction, chromatographic, NMR, and LC-MS methods. The anti-hyperglycemic activity was performed by the oral glucose tolerance test (OGTT). A freeze-dried infusion of *A. triangularis* leaves (Inf-L-At) was orally administrated to normoglycemic male rats at doses of 62.5, 125, and 250 mg/kg for 3 consecutive days. Animals received a glucose load (4g/kg) after 30 min of the treatment with Inf-L-At, and the blood glucose levels were verified at 15-, 30-, 60-, and 180-min. Intestinal maltase, lactase, and sucrase activities and quantification of muscle and liver glycogen content were also evaluated after OGTT. *Results:* Inf-L-At extract has led to a glycemic reduction no dose-response at 15, 30, and 60 min comparable to that of antidiabetic drug glibenclamide, and it was accompanied by an increase in hepatic glycogen content. In addition, there was a significant statistically decrease in the *in vitro* activity of disaccharidases. Maltase and sucrase were inhibited at all doses, whereas lactase only at 62.5 and 250 mg/kg. A total of 75 chemical constituents was found in the tea. Among them, new seven compounds: *rel*-(7*S*,8*S*,7'*S*,8'*R*)-4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-ol; 4'-hydroxy-3'-methoxy-3,4-methylenedioxy-7,9'-epoxylignan-9,7'-diol; diglycosylated 1-(4-hydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline; 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline; 1-(4-hydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline; *N*-ethyl-*N*-methyl-affineine; and *N*-methyl pachyconfine, in addition to one hitherto undescribed as a natural product: *eritro*-2-(5'-hydroxy-4'-methoxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol. *Conclusion:* The

results evidenced the anti-hyperglycemic action of the infusion from *A. triangularis* leaves and showed that it is an important source in lignoids, alkaloids, and glycosylated flavonoids, which are known to exhibit antidiabetic effects and other biological properties that can be health-beneficial of chronic hyperglycemia patients, thus certifying the popular use of this herbal drink.

Keywords: Aristolochiaceae, Diabetes, hyperglycemia, oral glucose tolerance test (OGTT), glycogen, disaccharidases

1. Introduction

Diabetes mellitus, a systemic chronic disease with slow progression and a complex and multifactorial nature, is a metabolic disturbance characterized by hyperglycemia, with type 2 diabetes corresponding to about 90% of diagnosed cases (Chatterjee et al., 2017). According to the first WHO global report, since 1980 the number of adults living with diabetes has almost quadrupled, reaching an estimated population of 422 million people in 2014 (WHO, 2016). In addition, this disease and its complications have been responsible for an estimated 3.8 million deaths annually (Anjana et al., 2018). The premature mortality rate has also increased significantly (*ca.* 5%) in the last decades (WHO, 2021). Thus, diabetes is undoubtedly one of the major public health problems, so much that the WHO's campaign theme in 2016 was about diabetes (WHO, 2016).

Such alarming data justify continued efforts aiming new therapeutic methods to treat patients with diabetes. Within this context, herbal drugs and phytochemicals continue to attract attention, provided that the utilization of plants, including some of the birthwort family (Heinrich et al., 2009; Trojan-Rodrigues et al., 2012), for the management of diabetes and its associated complications is widespread worldwide and plant-derived compounds have been shown to be promising candidates for new antidiabetic drugs (Trojan-Rodrigues et al., 2012; Brahmachari, 2016; Chen & Zhang, 2021).

The therapeutic potentials of *A. triangularis*, a highly-consumed plant with multiple ethnopharmacological uses and belonging to the family Aristolochiaceae, have been extensively investigated, and this species was showed to exhibit anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity, DNA interaction, anti-mycobacterial, larvicidal, antiprotozoal, antiproliferative, allelochemical, and antiviral activities (Mesa-Alicia et al., 1950; Schwartzman et al., 1977; Muschietti et al., 1996; Mongelli et al., 1997; Ciccia et al.,

2000; Mongelli et al., 2000; Amat et al., 2002; Oliveira et al., 2007; Pereira et al., 2018; Oliveira et al., 2019; da Silva et al., 2019; de Souza et al., 2020; Alegransi et al., 2021).

The leaf infusion of this plant has been popularly indicated for the treatment of diabetes in Brazil (Trojan-Rodrigues et al., 2012). However, its clinical utility is an inherently polemic issue because many studies on Aristolochiaceae spp. have focused on the carcinogenicity, mutagenicity, and nephrotoxicity of its representative chemical constituents, aristolochic acids (AAs) and aristolactams (ALs) (da Silva et al., 2019). Taking that into account, WHO has discouraged the use of *Aristolochia* spp. for medicinal purposes (Heinrich et al., 2009), and phytotherapies and/or health food supplements containing aristolochic acids or simply based on these plant species have been prohibited in several countries (Lopes et al., 2001; Nogueira & Lopes, 2012), including Brazil (ANVISA, 2014).

Despite this reality, over the past 21 years, this simplistic view has been contradicted and complete studies with plants from this notable ethnopharmacologically family have been stimulated before inferring hasty conclusions about their medicinal value, inasmuch as they are rich in other secondary metabolites besides nitrophenanthrene derivatives, predominantly lignoids, terpenoids, alkaloids, alkalamides, and flavonoids (Lopes et al., 2001; Hu et al., 2004; Sulyman et al., 2016; Zhou et al., 2019; da Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2021). In addition, aristolochic acids and aristolactams are not ubiquitous in the *Aristolochia* genus nor in all vegetative parts, and their concentrations are quite variable from species to species (Lopes et al., 2001; Hu et al., 2004; MICHL et al., 2016). Added to all these issues, several evidence has confirmed the huge medicinal potential of these plants (Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2018; Nogueira et al., 2021). Consequently, *Aristolochia* spp. have been reemerging as precious sources of bioactive natural products (Nogueira et al., 2021).

Almost 50 fixed chemical constituents were hitherto described to occur in *A. triangularis*. Nineteen nitrogen compounds, including fifteen phenanthrenic derivatives: AAs

I, II, C, and D; ALs I, AII, AIIIa, AIA, Ia, BII, and CII; triangularine A and B; cepharadione A; 4, 5-dioxodehydroasimilobine; magnoflorine; oblongine; *N,N*-dimethylindcarpine; and allantoin. Thirteen lignoids: hinokinin; kusunokinin; α and β -cubebin; 3,4-dimethoxy-3',4'-desmethylenedioxcubebin epimers; 3,4-desmethylenedioxy-3',4'-dimethoxycubebin epimers; fargesin; epieudesmin; dihydrocubebin; zuonin B; and galbacin. Eleven kaurane diterpenoids: *ent*-16 β (H)-kaurane; *ent*-kaur-16-en; *ent*-16 β (H)-kauran-17-oic acid; *ent*-kauran-16 α ,17-diol; *ent*-15 β ,16 β -epoxykauran-17-ol; *ent*-kaur-15-en-17-ol; *ent*-16 β ,17-epoxykauran; (–)-kaur-16-en-18-ol; (–)-kaur-16-en-18-al; (–)-kaur-16-en-18-acid; and (–)-kauran-16 α -ol-18-al. Four steroids: sitosterol; stigmast-4-en-3-on; stigmastan-3,6-dion; and stigmast-4-en-3,6-dion. Only the AL I and AAs I, II, C and D were found in leaves so far, by mean of metabolomic analyses based on NMR and LC-MS (Rücker & Langmann, 1978; Rücker et al., 1981; Lopes et al., 1990; Priestap et al., 1990; Leitão et al., 1991; Lin et al, 1997; Michl et al., 2016; Pereira et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

Despite the medicinal relevance of this species, there was no detailed study about its possible indication to treat diabetes, nor any report of a thorough chemical analysis of the composition of its leaves. Therefore, this study was designed to chemically characterize an infusion of *in natura* leaves of *A. triangularis*, as well as evaluate its *in vivo* antihyperglycemic properties, which were examined verifying its effect on blood glucose and hepatic and muscular glycogen content in normoglycemic rats in OGTT.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and identification

Healthy leaves of a specimen from *A. triangularis* Cham. were collected at the Medicinal Plants Garden of the Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil, during July 2017 to September 2018, and stored in a freezer at –20 °C until heat extraction steps.

The plant species was authenticated by Dr. Joelcio Freitas, and a voucher specimen (MBML53232) of them was deposited at the herbarium of Museum of Biology Prof. Mello Leitão (MBML), in the city of Santa Teresa, Espírito Santo State, Brazil. Authorization IBAMA number 51842. Access register SisGen/MMA number A1F6637.

2.1.1. Infusion preparation and liquid-liquid extractions

In batch portions of 160 g, a total of 2.56 kg from *A. triangularis in natura* leaves (cut into strips a few instants before use) were extracted (for 15 min) by infusion in pre-heated distilled water to 95 °C, to give 25.6 L of tea. A quarter (6.4 L) of the infusion obtained was frozen and then lyophilized (In-L-AT), to give 28.0 g of extract (E1; 4.4%), whereas the left over (19.2 L) was subjected to liquid-liquid extraction. Each 400 mL was initially diluted with 30 mL of a saturated KCl aqueous solution, and then extracted (once) with 125 mL of hexanes/ethyl acetate (1:3 v/v) and 100 mL of *n*-butanol, sucessively. Both organic phases (altogether 6.0 and 4.8 L, respectively) were washed with distilled water (each 125 mL or 100 mL: 2 × 25 mL) and concentrated to dryness, to give the fractions F1 (1.5 g; 0.08%) and F2 (2.0 g; 0.1%), respectively.

2.2. Chemical analysis

2.2.1. General experimental procedures

1D- (¹H, ¹³C, DEPT, and NOESY) and 2D- (¹H-¹H gCOSY, gNOESY, gHSQC, and gHMBC) NMR spectra were obtained at 500 MHz (¹H) and 126 MHz (¹³C) in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ on a Bruker® Avance III HD spectrometer (BBFO Plus SmartProbe™, New York, NY, USA). Solvent residual signals (CHCl₃: 7.26 ppm; CD₃SOCD₂H: 2.50 ppm) and the solvent signals [CDCl₃: 77.16 ppm; (CD₃)₂SO: 39.52 ppm] were used as internal references for ¹H and ¹³C NMR experiments, respectively; δ are reported relative to TMS.

2.3. HPLC-MS analyses

F1 and F2 fractions were analyzed by HPLC-ESI-MS. The samples (1 mg/mL) were analyzed using a Shim-pack XR-ODS column (Shimadzu; 2.0×75 mm, $2.2 \mu\text{m}$). The mobile phase was composed of water (A) and acetonitrile (B), the former containing 0.1% of acetic acid (v/v). The gradient elution program was: 0 to 8 min 3% B (isocratic elution), 8 to 60 min for 3 to 80% B (linear gradient), and 60 to 70 min for 80 a 3% B (linear gradient). The flow rate, column temperature, and injection volume were 0.3 mL/min, 40°C , and $5 \mu\text{L}$, respectively. Mass spectra were acquired in negative mode in the range of m/z 50 to 1,200. The optimized ESI parameter values were: capillary voltage, 4,500 V; dry gas temperature, 200°C ; drying gas, $9.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; nebulizer pressure, 4 bar.

2.3.1. Column chromatography and isolation of lignoids

A F1 portion (0.59 g) was subjected to column chromatography (CC) over silica gel 60 (70-230 mesh, 59 g, Hex-EtOAc-MeOH gradient, $\Phi = 2.9$ cm, $h = 19.2$ cm, dead volume ≈ 80 mL), to give 84 subfractions of 40 mL each. Subfractions 1-6 and 79-84 were eluted with hexanes and MeOH, respectively. Subfraction 7-66 were eluted (in sets of 6 sequentially) with Hex-EtOAc mixtures by starting with 5% EtOAc, followed by increments of 5% in 5% until the composition 1:1. Subfractions 67-72 were eluted with EtOAc, whereas subfractions 73-78 were eluted with EtOAc-MeOH (1:1). Subfraction 29 (13.9 mg) gave a mixture (3:1, respectively) of 25 and 28. Subfractions 38 and 39 (51.2 mg) gave an epimeric mixture 23a and 23b. Subfraction 41 gave a mixture of 24, 26, and 27. Subfractions 49-51 (70.1 mg) gave an epimeric mixture 19a and 19b. Subfractions 52 and 53 (38.0 mg) gave 18. Subfraction 69 (11.7 mg) gave 7. Subfraction 70 (34.4 mg) gave 15.

2.5. Isolated novel substance and NMR: new lignan (7)

rel-(7*S*,8*S*,7'*S*,8'*R*)-4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-ol (7)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 383.1473 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{20}H_{24}O_6Na$, 383.1471), 399.1208 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{20}H_{24}O_6K$, 399.1210). Negative HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 359.1500 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{20}H_{23}O_6$, 359.1495), 395.1266 $[M+Cl]^-$ (calcd for $C_{20}H_{24}O_6Cl$, 395.1261), 405.1546 $[M+HCO_2]^-$ (calcd for $C_{21}H_{25}O_8$, 405.1549). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.79/8.78 (s, 2H, OH-4,4'), 6.88 (br s, 1H, H-2'), 6.78 (d, $W_{1/2}$ = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.70 (d, $W_{1/2}$ = 8.1 Hz, 1H, H-5), 6.68 (br s, 2H, H-5',6'), 6.64 (dd, $W_{1/2}$ = 8.1 and 1.8 Hz, 1H, H-6), 5.04 (d, J = 4.6 Hz, 1H, OH-7'), 4.51 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-7), 4.36 (dd, J = 10.2 and 4.6 Hz, 1H, H-7'), 3.74 (s, 6H,), 3.40 (dd, $W_{1/2}$ = 10.0 and 8.6 Hz, 1H, H_{α} -9'), 3.35 (dd, $W_{1/2}$ = 8.6 and 7.7 Hz, 1H, H_{β} -9'), 2.45 (app ddt, J = 10.2, 10.0, and 7.7 Hz, 1H, H-8'), 2.26 (dq, J = 7.7, 7.2, and 3.3 Hz, 1H, H-8), 1.20 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3 -9). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 147.3 (C-3,3'), 145.5 (C-4'), 145.4 (C-4), 136.6 (C-1'), 134.7 (C-1), 118.4 (C-6'), 117.6 (C-6), 115.0 (C-5,5'), 110.2 (C-2'), 109.5 (C-2), 87.7 (C-7), 71.0 (C-7'), 68.8 (C-9'), 2 \times 55.6 (OCH_3 -3,3'), 48.6 (C-8'), 43.0 (C-8), 13.8 (C-9). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.87 (d, 1.8 Hz, 1H, H-2'), 6.87 (d, 8.0 Hz, 1H, H-5 or H-5'), 6.86 (d, 8.2 Hz, 1H, H-5 or H-5'), 6.82 (d, 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.79 (dd, 8.1 and 1.8 Hz, 2H, H-6,6'), 5.65 (br s, 1H, OH-4'), 5.57 (br s, 1H, OH-4), 4.63 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H-7), 4.59 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-7'), 3.89 (s, 3H, OCH_3 -3'), 3.88 (s, 3H, OCH_3 -3), 3.58 (dd, 8.7 and 8.0 Hz, 1H, H_{α} -9'), 3.46 (app t, 9.3 Hz, 1H, H_{β} -9'), 2.67 (dddd, J = 10.2, 9.9, 8.0 and 7.3 Hz, 1H, H-8'), 2.49 (dq, J = 7.3, 7.2, and 3.9 Hz, 1H, H-8), 1.31 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3 -9). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 146.8 (C-3'), 146.4 (C-3), 145.6 (C-4'), 144.7 (C-4), 135.7 (C-1'), 135.1 (C-1), 119.2 (C-6'), 118.3 (C-6), 114.3 (C-5'), 114.0 (C-5), 108.5 (C-2'), 108.0 (C-2), 88.6 (C-7), 73.2 (C-7'), 69.5 (C-9'), 2 \times 55.9 (OCH_3 -3,3'), 48.7 (C-8'), 43.1 (C-8), 14.0 (C-9).

2.4. *In vivo* experiments

2.4.1. *Chemical agents for experimental model*

Glibenclamide from Sigma® (St Louis, USA) was used for the positive control, it was diluted in 5% DMSO and 5% Tween, the final volume of the stock solution was obtained after adding ultrapure water type I (Milli-Q®). Drug administration was performed at the concentration of (100mg/kg. b.w.) by gavage.

2.4.2. *Animals*

Twenty-five male Wistar rats were used in this screening and were obtained from the Central Animal Facility of the Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, with a mean age of 50-55 days old and mean weight of 180-200 grams. The animals were kept in polypropylene cages, under controlled conditions, climatized room and light-dark cycle (lights off from 6:00 pm to 6:00 am), balanced feeding with commercial feed, water *ad libitum* as recommended by the Brazilian Council of Veterinary Medicine (CMV) and the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Afterwards they were monitored and following the Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) protocol, before the last treatment, they were fasted without food for 12 hours, but free access to water was maintained. This research was submitted to the Ethics Committee on Animal Use of the UFGD (CEUA/UFGD) and obtained a favorable decision (Protocol 13/2019).

2.4.3. *Bioassay of antihyperglycemic activity Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)*

Normoglycemic rats were randomized into five experimental groups with $n = 5$. These were: 1) GI, hyperglycemic control (1 mL of saline orally); 2) GII, positive control group (glibenclamide 100mg/kg orally); 3) GIII, group treated with Inf-L-At (62.5 mg/kg orally); 4) GIV, group treated with Inf-L-At (125 mg/kg orally); 5) GV, group treated with Inf-L-At (250

mg/kg orally). The plasma glucose levels of the animals were checked at the first time (time zero) to determine fasting blood glucose. Afterwards, the control groups were treated, then the groups GIII; GIV, and GV received Inf-L-At at doses 62.5, 125, and 250 mg/kg, respectively. After 30 minutes, all animals received glucose overload (4g/kg.bw) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), orally (gavage) (Pedroso et al., 2019). It was possible to obtain the dose-response curve subsequent to the evaluation of glucose levels, verified at the times: 15, 30, 60 and 180 minutes after the beginning of the test. The values were obtained using an Accu-Chek Performa® glucometer. After recording the glucose levels, the animals were anesthetized using an isoflurane inhalation agent, and submitted to euthanasia. For the other tests, the initial part of the small intestine was reserved for evaluation of the disaccharidase activity, in addition the liver and soleus muscle was dissected for determination of glycogen levels in the tissues (Felix et al., 2020).

2.8.2. Measurement of liver and muscle glycogen content after exposure to Inf-L-At

After 180 minutes, the OGTT protocol was completed, and the rats treated with glibenclamide or with one of the Inf-L-At doses, in hyperglycemic post-exposure conditions, were euthanized, and laparotomy was performed to extract the liver and soleus muscles, used for the dosage of residual glycogen. Both organs were weighed, and based on the obtained values, for each one the volumes of KOH and EtOH reagents were calculated. After this step, the tissues were triturated and homogenized in 33% KOH solution and exposed to a water bath at 100° C for 20 minutes, with agitation of each tube by slight movements. After cooling the samples, aliquots of 96% EtOH were added and again heated to 100° C until boiling, followed by cooling to an ice bath to optimize the precipitation of glycogen. The tissue homogenate from each sample was submitted to centrifugation at 300 rpm for 15 min, the supernatant was discarded, and the precipitate was neutralized with saturated NH₄Cl solution, and kept at 100°

C for 5 min. After this period, the samples were washed with ultrapure type I water (Milli-Q®), and resolubilized. The liver and muscle glycogen contents coming from the different treatments were defined using the calibration curve based on the glycogen standard substance, the analyses occurred after the addition of 2 mL of iodine reagent in 180µL of the soleus-muscle homogenate and in 500µL of the liver homogenate. All the measurements were taken at absorbance of 430 nm. The results were expressed as mg glycogen / g tissue (Kappel et al, 2012).

2.8.3. Determination of intestinal disaccharidases activity in vitro

To evaluate the activity of intestinal disaccharidases, a glucose oxidase kit (GOD) was used and the manufacturer's recommendations were followed. After laparotomy, the small intestine was collected and the jejunum segment was extracted from it. The portion of the duodenum was washed in 0.9% NaCl solution, dried on filter paper, weighed, and at a ratio of 400 mg of tissue per mL, the tissue was minced. Next, the homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 8 min (Pedroso et al., 2019) For determination of the activity of each enzyme, 150 µL of the supernatant, from each sample was pre-incubated at 37 °C for 5 min, prior to mixing with each substrate, and the total volume was fractionated into three 50 µL parts, and 25µL of one of the substrates (maltose, sucrose, and lactose) in phosphate buffer was added. After incubation at 37 °C for 5 min, 20µL aliquot was reserved, then 2 mL of GOD was added, in this last step, the analysis occurred in triplicate (Kappel et al, 2012). The specific activity was defined as the enzyme activity (U) per mg of protein (value equivalent to the amount of enzyme catalyzing a reaction with a formation speed of 1 micromol/minute) (Dahlqvist, 1984). In this assay, protein concentration was determined using 20 µL of the supernatant prepared earlier, and reserved for analysis by the biuret method, in duplicate and compared to the respective controls (Kappel et al, 2012) with adaptations (Felix et al., 2020).

2.9. Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical evaluation was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test using the value of $p < 0.05$ to consider significant differences between the treated and control groups. GraphPad Prism software were used (version 7.0; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Identification of the constituents from *Inf-L-At* by HPLC-MS analyses

HPLC-ESI-MS/MS and Column chromatography analyses revealed a total of 73 substances, of which 12 were isolated, including a new lignan, *rel*-(7*S*,8*S*,7'*S*, 8'*R*)-4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-ol (7), that due to the fact that it is novel, the NMR data of this substance are included in materials and methods. The other substances, *threo*-2-(4',5'-Methylenedioxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol (15), Dihydrocubebin (18), 3,4-dimethoxy-3,4-desmethylenedioxcubebin (19) (Major epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*R*)] (19a) e Minor epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*S*)] (19b)), *trans*-Cubebin (23) (Major epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*R*)] (23a) e Minor epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*S*)] (23b)), Kusunokinin (24), Hinokinin (25), Aristolignin (26), Nectandrin A (27), Talaumidin (28) were isolated, and have been described previously on *A. triangularis*, so NMR data of these substances are available in the supplemental materials. Among the novel substances, seven other new substances were identified in *A. triangularis* and annotated according to (Fig. 1-4), among them a lignan 4'-Hydroxy-3'-methoxy-3,4-methylenedioxy-7,9'-epoxylignan-9,7'-diol (8), cinco alcaloides: 1-(4-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline-hexose-pentose (40); 1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline (41), 1-(4-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinolineHydroxytyrosol (42), *N*-Ethyl-*N*-methyl-affineine (57) e *N*-

Methylpachyconfine (58), in addition to a new lignan *erythro*-2-(5'-Hydroxy-4'-methoxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol (9) described for the first time in natural products. By the methods used, in addition to the constituents mentioned above, 56 other constituents, already described in the species, were identified, and recorded in the analysis (Tables 1 and 2).

3.1. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The effect of Inf-L-At on serum glucose levels (mg/dL) in hyperglycemic rats is described in Table 3. The control group, after exposure to glucose overload (4 g/kg), recorded glucose peaks at 15 and 30 minutes after treatment, with attenuation of the peak at 60 minutes and significant decrease at 180 minutes. Glibenclamide administration (100 mg/kg) provided lower glucose peaks than the results observed in the control group, and the differences were statistically significant ($p < 0.05$). In this group, exposed to the oral hypoglycemic agent, antihyperglycemic effects were shown at 15, 30 and 60 minutes after exposure to glucose, as expected. Treatment with Inf-L-At at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg significantly decreased the glycemic peaks after exposure to glucose overload at 15, 30, 60 and 180 minutes in the OGTT, with the exception of Inf-L-At at a dose of 125 mg/kg, whose antihyperglycemic effect was significantly reduced ($p < 0.05$) compared to the other doses and to glibenclamide. In addition, only 180 minutes after treatment, it showed no statistical difference compared to the control group. These results show that there was no dose-response effect correlation between the respective administered doses. In comparison to the Area under the curve (AUC), all groups exposed to Inf-L-At were similar to the drug (glibenclamide).

3.2. Hepatic and muscle glycogen content in normoglycemic rats after OGTT

The effects of Inf-L-At on glycogen storage capacity in liver and muscle cells were evaluated after OGTT. Animals exposed to three different doses of Inf-L-At showed a significant increase in muscle glycogen content when compared to the control group, from which they differed significantly ($p < 0.05$) (Fig.5 A). However, they showed similar effects compared to the glibenclamide-treated group, i.e., in this case, Inf-L-At administered at a dose of 62.5 mg/kg was more effective than the other doses. In the liver of animals exposed to the infusion, significant increases in stored glycogen were observed, with statistically significant differences compared to the control group ($p < 0.05$) (Fig.5.B). However, there was no relationship between effect and dose - response, since Inf-L-At at doses of 62.5 and 250 mg/kg exhibited more significant effects in increasing glycogen in liver and muscle cells compared to the intermediate dose.

3.3. Effect of Inf-L-At on the activity of disaccharidases after OGTT

Inf-L-At was evaluated regarding the potential effects on the activity of intestinal disaccharidases, maltase, lactase and sucrase, and the results show that after exposure to the different doses of the infusion, there was a significant reduction in the activity of intestinal enzymes maltase and sucrase ($p < 0.05$) compared to the control group (Fig.6). On the other hand, only Inf-L-At at doses 62.5 and 250 mg/Kg exhibited inhibitory effects on lactase activity, moreover, in this analysis the dose of 125 mg/kg showed similar effect to the control group. The data show that there is no dose-response relationship of the doses used with the inhibitory effects on the activities of disaccharidases.

4. Discussion

A. triangularis has broad ethnopharmacological relevance and its bioactive potentials are described in several researches, nevertheless, scientific studies on the effects of the leaf tea

of this species are still scarce (Silva et al., 2019). In folk medicine, the leaves are the most commonly used parts to treat diabetes, whereby tea is obtained by infusing 5 to 50 g of healthy leaves (Trojan-Rodrigues et al., 2012).

Among the therapeutic purposes attributed to the species the most common are for the treatment of rheumatism, skin diseases and snake bites, in addition to its antifungal activity and antihyperglycemic and antidiabetes therapies (Heinrich et al., 2009; Trojan-Rodrigues et al., 2012; Silvia et al., 2018). In this study, the results observed by OGTT, in association with the analysis of liver and muscle glycogen content, and the activity of the disaccharities maltase, lactase and sucrase, allowed assertive correlations in front of the popular use of this species. Subsequently, the chemical constitution of *A. triangularis* leaves, described in the respective study, is comprised of 75 substances identified by HPLC-ESI-MS/MS and column chromatography analyses. Of these, eight constituents are novel, among them: three new lignans (7), (8) and (9), the latter lignan being described for the first time in natural products, and five new alkaloids (40), (41), (42), (57), (58), with promising biological activities.

There are few studies on the potential antihyperglycemic effect empirically attributed to *A. triangularis*, however, other species of this genus have been evaluated, such as *A. indica*, which has demonstrated antihyperglycemic effect in rats, corroborating its ethnopharmacological relevance, since this species is widely used by the Nigerian population in traditional medicine (Karan et al., 2012). Research developed in rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes, evaluated the effects of the ethanolic extract of *A. ringens* root, after exposure to concentrations of 75mg/kg, 150mg/kg, and 300mg/kg for 14 days, and revealed hypoglycemic effects, at the doses used, similar to the effects exhibited by metformin. There was a reduction in glucose concentrations to levels of glycemic normality, especially in animals treated with the 300 mg/kg dose (Sulyman et al., 2019).

Hyperglycemia is a consequence of the absence or decreased secretion and action of insulin and is characteristic of type 2 diabetes mellitus (DM2), which in the long term can lead to neuropathy, nephropathy, retinopathy, heart disease, and neurovascular disease (ADA, 2011; IDF, 2017). In animal models, among the substances used for diabetes induction, alloxan and streptozotocin are the most usual. Many of them act by cytotoxic mechanisms and are selective for destruction of pancreatic β -cells and, in addition, stimulate pancreatic insulin insufficiency (Varshney et al., 2017). Among the main oral hypoglycemic drugs, the most prominent is glibenclamide, a second-generation sulfonylurea used in the treatment of diabetes (Kappel, 2012). Like the other sulfonylureas, this antihyperglycemic acts by blocking KATP channels, with depolarization of the β -cell membrane. Some of its main mechanisms of action include that, when binding to SUR subunits, it triggers a stimulatory effect with insulin secretion and hypoglycemic effect (Ashcroft et al., 2000).

The results obtained by OGTT, in this study, demonstrate that animals exposed to Inf-L-At in the evaluated doses (62.5, 125, and 250 mg/kg) showed significant reduction in glucose peaks immediately after glucose overload. Among these groups, the ones treated with the doses of 62.5 and 125 mg/kg stand out, showing significant effects maintained for up to 180 min after the beginning of the test, similarly to glibenclamide.

Not only is this research the first to evidence antihyperglycemic effects in male Wistar rats after exposure to tea from this species, it is also the first to characterize the robust chemical constitution of *A. triangularis* leaves, with probable biological potentials for antihyperglycemia. Sulyman et al. (2019) characterized the chemistry of *A. rigens*, similarly to this study, with rich amounts of flavonoids (23.03%), phenolic compounds (19.15%), and alkaloids (16.13%). In other studies, the chemical constitution of *A. triangularis* has been described by the presence of aporphins, protoberberins, isoquinolines, benzyloquinolines,

starches, glycosylated flavonoids, lignans, thretalones, diphenyl ethers, terpenoids, benzenoids, steroids, and others (Kuo et al., 2012).

Similarly, the results of the chemical analysis of Inf-L-At showed a rich chemical constitution in lignans and glycosylated flavonoids, which is in accordance with other chemical studies of the genus *Aristolochia*: in this genus, there are inexhaustible sources of flavonoids, particularly diglycosides, phenolic compounds such as phenylethyl, phenanthrene derivatives, phenylpropanoids, lignoids, alkaloids and alkaloids. Furthermore, by the chemical analysis of this research, eight novel substances were identified and will provide a better understanding of the species and its pharmacological properties.

Commonly, natural products are traditionally rich in flavonoids, whose class of secondary metabolites are biologically active and have antiviral, antiallergic, antibacterial, anti-inflammatory functions, and potential antioxidant effects (Kappel et al., 2013; Boas et al., 2018). *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate that these constituents are able to prevent diabetes and its complications by having underlying molecular mechanisms, acting on glucose transporters, being inhibitors of tyrosine kinase and enzymes involved in liver and muscle glycogen storage, as well as acting under AMPK, PPAR, and NF- κ B, and also influencing the regulation of the lipid profile (Al-Ishaq et al., 2019).

Disaccharidases (maltase, lactase, and sucrase) are intestinal enzymes with an essential function in converting disaccharides into monosaccharides through hydrolysis, increasing glucose absorption in the intestine and serum glucose levels. Generally, in diabetic and/or hyperglycemic individuals, this activity is increased (Nelson et al., 2014). Many hypoglycemic agents, especially when rich in glycosylated flavonoids, provide a decrease in glucose absorption and, with inhibition of α -glucosidase and α -amylase, a decrease in intestinal absorption of glucose, oligosaccharides, and disaccharides (Hsu et al., 2009).

A. triangularis leaf infusion was shown to be effective in inhibiting the activity of intestinal enzymes maltase, lactase, and sucrase, and although there is no dose-response correlation, the effects are probably justified by the large amount of kaempferol-hexose-pentose-rannose and quercetin identified in *A. triangularis*. On the other hand, in several *in vivo* studies, not all flavonoids were active in reducing the glycemic peak in induced hyperglycemia, probably because they form complexes that are eliminated prior to absorption. Contrarily, Cazarolli et al. 2006 reported that the glycosylated flavonoids Kempferol-3-neohesperidoside is promising oral hypoglycemic.

Since glucose has hydrophilic nature, it does not diffuse easily across the plasma membrane. For this, two types of glucose transporters are required, the facilitators (GLUT) and the active ones, linked to sodium ions (of which there are two main types - SGLT1 and SGLT2). The action of most therapeutic products with hypoglycemic effects occurs by controlling intestinal or renal absorption with the inhibition of SGLT1 and SGLT2 (Navale et al., 2016). In this sense, the evaluation of the effects of the infusion on the activity of intestinal enzymes makes it possible to establish correlation with the probable pathways of reduction of serum glucose levels.

In the evaluation regarding the hepatic and muscle glycogen content, it is observed that there was an inversely proportional relationship compared to the OGTT results. In this example, animals exposed to Inf-L-At at the different doses presented, simultaneously, a reduction in the glycemic peaks and an increase in the content of liver and muscle glycogen. Skeletal muscle tissue is responsible on average for 80% of post prandial glucose uptake. After entering the muscle cell, glucose is directed to two pathways, glycolysis and glycogen synthesis, the latter being considered the main pathway (Alkhalidy et al., 2018). The mechanism of action of some plants and antihyperglycemic drugs is related to the increase in insulin secretagogues

and/or the acquisition of resistance to the hormone, favoring glucose uptake by tissues and consequently leading to greater glycogen synthesis (Felix et al., 2020).

Al-Ishaq et al., 2019, report that several studies have pointed out effective antihyperglycemic mechanisms of action present in flavonoids, not only in regulating intestinal enzymes, but also in increasing glucose uptake, in muscle and liver tissues. In other studies, quercetin is attributed to decreasing serum glucose levels and activating protein kinase (AMPK) with a mechanism similar to metformin, with stimuli for glucose uptake in muscle and liver cells through glycogenesis (Bule et al., 2019).

In the results after HPLC analysis, different types of Kaempferol were found, and to these flavonoids several antidiabetic effects are described, such as: enhancing AMPK expression and activation; ameliorating cell apoptosis events by suppressing caspase 3 activities; and increasing insulin production and secretion. Subsequently, this constituent increases glucose uptake by liver and muscle cells via the protein kinase C and PI3K pathways, and the synthesis of new glucose transporters. Thus, there is a reduction in serum HbA1c levels, fasting blood glucose, and decreased insulin resistance (Coskun et al., 2005; Eid et al., 2010; Bule et al., 2019). In sum, the results of this study clarify that *A. triangularis* shows similar antihyperglycemic effects to glibenclamide administered at 100 mg/kg. Furthermore, in view of the broad chemical constitution in the leaves of this species, caution is essential in interpreting the possible mechanisms of interactions and substances directly in the antihyperglycemic effects attributed to Inf-L-At.

5. Conclusion

In conclusion, the results of this research indicate that *A. triangularis* has antihyperglycemic potential, the three doses used exhibited similar effects to glibenclamide, by OGTT, and also contributed significantly to increased glycogenesis in muscle and liver tissue.

Furthermore, Inf-L-At reduced maltase, lactase and sucrase activity compared to the control group, with decreased glucose uptake, and respectively attenuating serum glucose levels. In short, these results corroborate the use of this species in folk medicine, and highlight its beneficial biological potential for therapeutic purposes in the prevention or treatment of diabetes, although further studies should be conducted with fractions enriched with key chemical constituents described so far.

Acknowledgments

The authors are grateful the MSc. Joelcio Freitas for botanical identification. J. D. A. da Silva and the CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for a fellowship, thank.

Declaration of conflict od interestes

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version. It includes the NMR data of the isolated substances, and a table description of the 61 other substances noted, but not isolated, among them the unpublished substances present in *Aristolochia triangularis*.

1. Substances described above and isolated in this study of *A. triangularis* and NMR

threo-2-(4',5'-Methylenedioxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol (**15**)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 397.1629 [M+Na]⁺ (calc for C₂₁H₂₆O₆Na, 397.1627), 413.1367 [M+K]⁺ (calc for C₂₁H₂₆O₆K, 413.1366). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.80 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6''), 6.76 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-6'), 6.65 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-3''), 6.64 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-3'), 6.62 (dd, J = 8.1 and 1.9 Hz, 1H, H-7''), 6.57 (dd, J = 7.9 and 1.5 Hz, 1H, H-7'), 2×5.94 (d, $W_{1/2}$ = 1.0 Hz, 2H, -OCH₂O-), [2×-CH₂OH: 4.55 (t, J = 4.6 Hz, 1H) and 4.54 (t, J = 4.8 Hz, 1H)], 3.70 (s, 3H, OCH₃-5''), 3.67 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.29-3.43 (comp, 4H, H-1_a,1_b,4_a,4_b), [H-1'_a,1'_b,1''_a,1''_b: 2.56 (dd, J = 13.7 and 6.6 Hz, 2H), 2.50 (comp, 1H), and 2.48 (comp, 1H)], [H-2,3: (m, 1.84, 1H) and (m, 1.80, 1H)]. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 148.5 (C-4''), 147.0 and 146.8 (C-4',5''), 145.0 (C-5'), 135.3 (C-2'), 133.9 (C-2''), 121.7 (C-7'), 120.9 (C-7''), 112.6 (C-3''), 111.7 (C-6''), 109.2 (C-3'), 107.8 (C-6'), 100.5 (-OCH₂O-), 60.3 and 60.1 (C-1,4), 55.5 (OCH₃-5''), 55.3 (OCH₃-4''), 42.7 and 42.4 (C-2,3), 34.0 and 33.9 (C-1',1''). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.77 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 6.70 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.68 (dd, J = 8.1 and 1.9 Hz, 1H, H-6'), 6.65 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-2'), 6.62

(d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-2), 6.59 (dd, $J = 7.8$ and 1.6 Hz, 1H, H-6), 5.91 (br s, 2H, -OCH₂O-), [H-1_a,1_b,4_a,4_b: 3.92-3.80 (m, 2H) and 3.79 (app dt, $W_{1/2} = 11.2$ and 1.9 Hz, 2H)], 3.85 and 3.83 (6H, 2×OCH₃), [2×-CH₂OH: 3.53 (dd, $J = 4.2$ and 2.8 Hz, 1H) and 3.49 (dd, $J = 4.3$ and 2.7 Hz, 1H)], [H-1'_a,1'_b,1''_a,1''_b: 2.77 (dd, $J = 13.9$ and 8.2 Hz, 1H), 2.75 (dd, $J = 14.1$ and 8.0 Hz, 1H), 2.65 (comp, 1H), and 2.62 (comp, 1H)], 1.80-1.92 (m, 2H, H-2,3). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 148.8 (C-4''), 147.5 (C-4'), 147.2 (C-5''), 145.7 (C-5'), 134.3 (C-2'), 133.0 (C-2''), 121.8 (C-7'), 120.9 (C-7''), 112.0 (C-3''), 111.0 (C-6''), 109.3 (C-3'), 108.0 (C-6'), 100.8 (-OCH₂O-), 60.4 and 60.3 (C-1,4), 55.9 and 55.8 (OCH₃-4'',5''), 44.0 and 43.9 (C-2,3), 35.9 and 35.7 (C-1',1'').

Dihydrocubebin (18)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 359.1490 [M+H]⁺ (calc for C₂₀H₂₃O₆, 359.1495), 381.1311 [M+Na]⁺ (calc for C₂₀H₂₂O₆Na, 381.1314). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-5,5'), 6.64 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H-2,2'), 6.60 (dd, $J = 7.8$ and 1.5 Hz, 2H, H-6,6'), 5.92 (br s, 4H, 2×-OCH₂O-), 3.79 (dd, $J = 11.4$ and 1.9 Hz, 2H, H-9_a,9'_a), 3.52 (dd, $J = 11.4$ and 4.5 Hz, 2H, H-9_b,9'_b), 2.75 (dd, $J = 13.7$ and 8.6 Hz, 2H, H-7_a,7'_a), 2.62 (dd, $J = 13.7$ and 5.9 Hz, 2H, H-7_b,7'_b), 1.84 (dddd, $J = 8.6, 5.9, 4.5,$ and 1.9 Hz, 2H, H-8,8'). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 147.8 (C-3,3'), 145.9 (C-4,4'), 134.5 (C-1,1'), 122.0 (C-6,6'), 109.5 (C-2,2'), 108.3 (C-5,5'), 101.0 (2×-OCH₂O-), 60.6 (C-9,9'), 44.4 (C-8,8'), 36.1 (C-7,7').

3,4-dimethoxy-3,4-desmethylenedioxcubebin (19)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 395.1470 $[M+Na]^+$ (calc for $C_{21}H_{24}O_6Na$, 395.1471). Molar ratio between **19a**:**19b** in $CDCl_3$: 1.00:0.74.

Major epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*R*)] (**19a**): 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 6.69 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5), 6.62 (dd, $J = 8.1$ and 2.0 Hz, 1H, H-6'), 6.55 (d, $W_{1/2} = 1.7$ Hz, 1H, H-2), 6.55 (dd, $W_{1/2} = 8.2$ and 1.7 Hz, 1H, H-6), 6.53 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 5.91-5.93 (comp, 2H, $-OCH_2O-$), 5.23 (br s, 1H, H-9), 4.00 (dd, $J = 8.6$ and 7.2 Hz, 1H, H-9'a), 3.85 (s, 3H, OCH_3-4'), 3.82 (s, 3H, OCH_3-3'), 3.81 (dd, $J = 8.6$ and 8.0 Hz, 1H, H-9'b), 2.66 (m, 1H, H-7'a), 2.65 (m, 1H, H-7'a), 2.60 (m, 1H, H-7'b), 2.44 (m, 1H, H-7'b), 2.17 (m, 1H, H-8'), 2.16 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 148.8 (C-3'), 147.5 (C-3), 147.4 (C-4'), 145.9 (C-4), 133.3 (C-1), 132.9 (C-1'), 121.7 (C-6), 120.5 (C-6'), 111.7 (C-2'), 111.2 (C-5'), 109.1 (C-2), 108.0 (C-5), 103.4 (C-9), 100.9 ($-OCH_2O-$), 72.3 (C-9'), 55.9 (OCH_3-4'), 55.7 (OCH_3-3'), 53.2 (C-8), 45.9 (C-8'), 39.1 (C-7'), 38.4 (C-7).

Minor epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*S*)] (**19b**): 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 6.74 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-2), 6.72 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.68 (dd, $J = 7.9$ and 1.6 Hz, 1H, H-6), 6.68 (dd, $J = 8.1$ and 2.0 Hz, H-6'), 6.64 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 5.91-5.93 (comp, 2H, $-OCH_2O-$), 5.24 (br s, 1H, H-9), 4.10 (app t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9'a), 3.87 and 3.86 (s, $2 \times 3H$, OCH_3-3' and OCH_3-4'), 3.59 (dd, $J = 8.5$ and 7.3 Hz, 1H, H-9'b), 2.80 (m, 1H, H-7'a), 2.78 (dd, $J = 13.7$ and 10.1 Hz, 1H, H-7'a), 2.61 (dd, $J = 13.7$ and 5.9 Hz, 1H, H-7'b), 2.47 (m, 1H, H-8'), 2.46 (m, 1H, H-7'b), 2.02 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 148.9 (C-3'), 147.7 (C-4'), 147.5 (C-3), 145.7 (C-4), 134.5 (C-1), 132.7 (C-1'), 121.6 (C-6), 120.5 (C-6'), 111.8 (C-2'), 111.2 (C-5'), 109.3 (C-2), 108.1 (C-5), 100.8 ($-OCH_2O-$), 98.9 (C-9), 72.7 (C-9'), 55.9 and 55.8 (OCH_3-3' and OCH_3-4'), 52.1 (C-8), 42.9 (C-8'), 38.8 (C-7'), 33.6 (C-7).

trans-Cubebin (23)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 379.1158 $[M+Na]^+$ (calc for $C_{20}H_{20}O_6Na$, 379.1158). Molar ratio between **23a**:**23b** in $CDCl_3$: 1.00:0.64.

Major epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*R*)] (**23a**): 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.70 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 6.57 (d, $W_{1/2} = 1.6$ Hz, 1H, H-2), 6.55 (dd, $W_{1/2} = 7.8$ and 1.6 Hz, 1H, H-6), 6.51 (d, $W_{1/2} = 1.7$ Hz, 1H, H-2'), 6.51 (dd, $W_{1/2} = 8.2$ and 1.7 Hz, 1H, H-6'), 5.91-5.93 (comp, 4H, 2 \times -OCH $_2$ O-), 5.22 (br s, 1H, H-9), 4.00 (dd, $J = 8.6$ and 7.1 Hz, 1H, H-9'a), 3.79 (dd, $J = 8.6$ and 7.9 Hz, 1H, H-9'b), 2.65 (dd, $J = 13.9$ and 7.6 Hz, 1H, H-7'a), 2.61 (m, 1H, H-7'a), 2.58 (m, 1H, H-7'b), 2.43 (comp, 1H, H-7'b), 2.15 (m, 1H, H-8'), 2.14 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 2 \times 147.6 (C-3,3'), 145.9 (C-4), 145.8 (C-4'), 134.1 (C-1'), 133.3 (C-1), 121.7 (C-6), 121.4 (C-6'), 109.2 (C-2), 108.9 (C-2'), 2 \times 108.1 (C-5,5'), 103.4 (C-9), 2 \times 100.8 (2 \times -OCH $_2$ O-), 72.3 (C-9'), 53.1 (C-8), 45.9 (C-8'), 39.2 (C-7'), 38.4 (C-7).

Minor epimer [rel-(8*R*,8'*R*,9*S*)] (**23b**): 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.73 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-2), 6.72 (d, $W_{1/2} = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.69 (dd, $W_{1/2} = 8.0$ and 1.4 Hz, 1H, H-6), 6.68 (d, $W_{1/2} = 7.9$ Hz, 1H, H-5'), 6.62 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-2'), 6.59 (dd, $W_{1/2} = 7.9$ and 1.6 Hz, 1H, H-6'), 5.91-5.93 (comp, 4H, 2 \times -OCH $_2$ O-), 5.23 (br s, 1H, H-9), 4.10 (app t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-9'a), 3.57 (dd, $J = 8.5$ and 7.3 Hz, 1H, H-9'b), 2.76 (dd, $J = 13.8$ and 9.9 Hz, 1H, H-7'a), 2.75 (comp, 1H, H-7'a), 2.59 (comp, 1H, H-7'b), 2.59 (comp, 1H, H-7'b), 2.44 (comp, 1H, H-8'), 2.00 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 147.7 (C-3'), 147.6 (C-3), 146.0 (C-4'), 145.7 (C-4), 134.5 and 133.9 (C-1,1'), 121.6 (C-6), 121.4 (C-6'), 109.3 (C-2), 108.9 (C-2'), 2 \times 108.2 (C-5,5'), 2 \times 100.8 (2 \times -OCH $_2$ O-), 98.9 (C-9), 72.6 (C-9'), 52.1 (C-8), 42.9 (C-8'), 38.9 (C-7'), 33.6 (C-7).

Kusunokinin (24)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 371.1505 $[M+H]^+$ (calc for $C_{21}H_{23}O_6$, 371.1495), 388.1759 $[M+NH_4]^+$ (calc for $C_{21}H_{26}NO$, 388.1760), 393.1315 $[M+Na]^+$ (calc for $C_{21}H_{22}O_6Na$, 393.1314), 409.1049 $[M+K]^+$ (calc for $C_{21}H_{22}O_6K$, 409.1053). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 6.71 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 6.60 (d, $W_{1/2} = 1.6$ Hz, 1H, H-2), 6.59 (dd, $W_{1/2} = 7.8$ and 1.6 Hz, 1H, H-6), 6.57 (dd, $J = 8.1$ and 2.0 Hz, 1H, H-6'), 6.48 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 5.94 (d, $W_{1/2} = 1.5$ Hz, 1H, $-OCH_2O-$), 5.93 (d, $W_{1/2} = 1.5$ Hz, 1H, $-OCH_2O-$), 4.15 (dd, $J = 9.1$ and 7.1 Hz, 1H, H-9'a), 3.88 (dd, $J = 9.1$ and 7.5 Hz, 1H, H-9'b), 3.86 (s, 3H, OCH_3-4'), 3.83 (s, 3H, OCH_3-3'), 2.96 (dd, $J = 14.1$ and 5.2 Hz, 1H, H-7'a), 2.85 (dd, $J = 14.1$ and 7.2 Hz, 1H, H-7'b), 2.62 (m, 1H, H-7'a), 2.56 (ddd, $W_{1/2} = 8.2, 7.2,$ and 5.2 Hz, 1H, H-8), 2.50 (m, 1H, H-7'b), 2.48 (m, 1H, H-8'). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 178.5 (C-9), 149.1 (C-3'), 2 \times 147.9 (C-3,4'), 146.5 (C-4), 131.4 (C-1), 130.4 (C-1'), 122.3 (C-6), 120.6 (C-6'), 111.7 (C-2'), 111.3 (C-5'), 109.5 (C-2), 108.2 (C-5), 101.0 ($-OCH_2O-$), 71.2 (C-9'), 55.9 (OCH_3-4'), 55.8 (OCH_3-3'), 46.5 (C-8), 41.2 (C-8'), 38.3 (C-7'), 34.8 (C-7).

Hinokinin (25)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 355.1179 $[M+H]^+$ (calc for $C_{20}H_{19}O_6$, 355.1182), 377.0999 $[M+Na]^+$ (calc for $C_{20}H_{18}O_6Na$, 377.1001). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.73 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.63 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-2), 6.60 (dd, $J = 7.9$ and 1.7 Hz, 1H, H-6), 6.46 (dd, $W_{1/2} = 8.2$ and 1.7 Hz, 1H, H-6'), 6.46 (d, $W_{1/2} = 1.7$ Hz, 1H, H-2'), 5.92–5.95 (comp, 4H, 2 \times - OCH_2O-), 4.13 (dd, $J = 9.2$ and 7.1 Hz, 1H, H-9 β), 3.86 (dd, $J = 9.2$ and 7.2 Hz, 1H, H-9 α), 2.98 (dd, $J = 14.1$ and 5.0 Hz, 1H, H-7'a), 2.84 (dd, $J = 14.1$ and 7.3 Hz, 1H, H-7'b), 2.59 (m, 1H, H-7'a), 2.53 (ddd, $J = 8.3, 7.3,$ and 5.0 Hz, 1H, H-8 α), 2.46 (m, 1H, H-7'b), 2.46 (m, 1H, H-8' β). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 178.4 (C-9), 2 \times 147.8 (C-3,3'), 146.5 and 146.4 (C-4,4'), 131.6 (C-1'), 131.3 (C-1), 122.2 (C-6), 121.5 (C-6'), 109.4 (C-

2), 108.8 (C-2'), 108.4 and 108.3 (C-5,5'), 101.0 (2×-OCH₂O-), 71.1 (C-9'), 46.5 (C-8), 41.3 (C-8'), 38.4 (C-7'), 34.8 (C-7).

Aristolignin (26)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, *m/z*: 359.1860 [M+H]⁺ (calc for C₂₁H₂₇O₅, 359.1858), 381.1677 [M+Na]⁺ (calc for C₂₁H₂₆O₅Na, 381.1678).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.99 (dd, *J* = 8.2 and 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.88 (comp, 1H, H-6'), 6.87 (comp, 1H, H-2'), 6.84 (d, *W*_{1/2} = 8.6 Hz, 1H, H-3'), 5.61 (s, 1H, OH-4'), 5.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-7'), 4.40 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-7), 3.92 (s, 3H, OCH₃-3), 3.88 (s, 3H, OCH₃-3'), 3.86 (s, 3H, OCH₃-4'), 2.25 (m, 1H, H-8'), 1.78 (m, 1H, H-8), 1.06 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃-9), 0.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃-9'). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 148.5 (C-3'), 148.1 (C-4'), 146.4 (C-3), 145.4 (C-4), 133.8 (C-1'), 132.8 (C-1), 119.3 (C-6), 119.2 (C-6'), 114.2 (C-5), 110.7 (C-5'), 110.4 (C-2'), 109.3 (C-2), 87.4 (C-7), 83.0 (C-7'), 55.7-56.0 (3× OCH₃-3,3',4'), 47.8 (C-8), 46.0 (C-8'), 14.9 and 15.0 (C-9,9').

Nectandrin A (27)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, *m/z*: 359.1860 [M+H]⁺ (calc for C₂₁H₂₇O₅, 359.1858), 381.1677 [M+Na]⁺ (calc for C₂₁H₂₆O₅Na, 381.1678). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.98 (comp, 1H, H-2'), 6.97 (comp, 1H, H-6'), 6.96 (comp, 1H, H-2), 6.91 (comp, 1H, H-5), 5.58 (s, 1H, OH-4'), 4.51 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-7'), 4.50 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-7), 2.32 (m, 2H, H-8,8'), [2×CH₃-9,9': 1.04 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H) and 1.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H)]. ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 119.3 (C-6), 118.6 (C-6'), 114.1 (C-5), 111.0 (C-5'), 109.8 (C-2'), 109.4 (C-2), 87.3 and 87.2 (C-7,7'), 55.7-56.0 (3× OCH₃-3,3',4'), 2×44.3 (C-8,8'), 12.9 and 13.0 (C-9,9').

Talaumidin (28)

Positive HR-ESI-MS (probe) 4,500 V, m/z : 343.1545[M+H]⁺ (calc for C₂₀H₂₃O₅, 343.1546), 365.1363[M+Na]⁺ (calc for C₂₀H₂₂O₅Na, 365.1365), 381.1096 [M+K]⁺ (calc for C₂₀H₂₂O₅K, 381.1104). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.93 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.92 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H-2'), 6.88 (d, $W_{1/2}$ = 8.0 Hz, 1H, H-5), 6.85 (dd, $W_{1/2}$ = 8.0 and 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.83 (dd, $W_{1/2}$ = 8.0 and 1.6 Hz, 1H, H-6'), 6.77 (d, $W_{1/2}$ = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 5.94 (2H, -OCH₂O-), 5.58 (s, 1H, OH-4), 4.61 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H-7), 4.61 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H-7'), 3.91 (s, 3H, OCH₃-3), 1.73-1.78 (m, 2H, H-8,8'), 1.04 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-9'), 1.02 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃-9). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 147.8 (C-3'), 146.9 (C-4'), 146.7 (C-3), 145.1 (C-4), 136.5 (C-1'), 134.1 (C-1), 119.7 (C-6'), 119.4 (C-6), 114.0 (C-5), 108.6 (C-2), 107.9 (C-5'), 106.6 (C-2'), 100.9 (-OCH₂O-), 88.4 (C-7), 88.2 (C-7'), 56.0 (-OCH₃), 51.1 and 50.9 (C-8,8'), 2×13.8 (C-9,9').

Table 1. Chemical constituents tentatively or definitively identified in the F1 fraction rich in lignoids by HPLC-ESI-MS/MS.

N°.	t_r (min)	FM	Ionized molecules and ion fragments (m/z)					Annotation or identification(**)
			MS	Error	MS	Error	MS ² [positive (#) and negative (*) modes]	
1	36.8/5.85	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	282.1485 [M+H] ⁺	-3.2			#251.11; 236.08; 219.08; 191.08	<i>O</i> -Nornuciferine
2	41.5/5.59	C ₉ H ₈ O ₃	165.0545 [M+H] ⁺	-4.2	163.0400 [M-H] ⁻	+3.1	#147.04; 123.04; 119.05; 91.05; *119.05	<i>p</i> -coumaric acid
3	43.6/5.69	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	399.1415 [M+Na] ⁺	-1.3	375.1450 [M-H] ⁻	+1.6	#341.14; 323.13; 291.10; 263.11; 231.08; 217.09; 199.07; 187.07; 175.07; 163.08; 137.06; *357.13; 327.12; 297.11; 279.06; 195.06; 179.07; 165.06; 105.3	4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan-9,7'-diol
4	46.8/6.21	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	197.1171 [M+H] ⁺	-3.6			#179.11; 161.10; 151.11; 135.12; 133.10; 123.12; 119.08; 107.09; 91.05	Loliolide
5	47.2/6.42	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	385.1617 [M+Na] ⁺	-2.6	361.1652 [M-H] ⁻	+0.3	#327.16; 295.13; 263.11; 203.10; 171.08; 163.07; 151.07; 137.06; 133.06; *346.14; 331.15; 313.14; 239.07; 223.10; 179.07; 165.06; 147.05; 105.04; 93.04	2-(5'-Hydroxy-4'-methoxybenzyl)-3-(5''-hydroxy-4''-methoxybenzyl)-butan-1,4-diol
6	49.7/7.10	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	344.1502 [M+H] ⁺	+1.2	342.1347 [M-H] ⁻	+1.8	#177.05; 151.08; 149.06; 145.03; 117.03; *327.11; 312.07; 191.06; 178.05; 148.05	<i>N</i> - <i>trans</i> -Feruloyl-4'- <i>O</i> -methyldopamine
7	50.0/6.99	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	383.1473 [M+Na] ⁺	+0.5	359.1500 [M-H] ⁻	+1.4	#343.15; 325.14; 310.12; 293.12; 283.10; 278.09; 265.10; 261.09; 233.09; 219.10; 201.09; 191.11; 189.09; 169.06; 151.07; 137.06; *341.14; 329.14; 311.13; 296.11; 281.08; 189.09; 179.07; 174.07; 164.05; 151.04; 136.02; 109.03	<i>rel</i> -(7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>R</i>)-4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-ol**
8	50.2/7.15	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	397.1257 [M+Na] ⁺	-1.5	373.1291 [M-H] ⁻	+1.1	#339.12; 321.11; 309.11; 291.10; 289.09; 277.08; 268.08; 261.09; 231.08; 217.09; 187.07; 185.06; 137.06; 135.04; *355.12; 340.09; 325.10; 310.08; 205.09; 190.06; 189.06; 187.07; 175.08; 172.05; 171.04; 161.06; 160.05	4'-Hydroxy-3'-methoxy-3,4-methylenedioxy-7,9'-epoxylignan-9,7'-diol
9	50.7/7.15	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	399.1782 [M+Na] ⁺	-0.5			#359.19; 326.17; 151.08; 137.06	<i>eritro</i> -2-(5'-Hydroxy-4'-methoxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol

10	52.3/7.46	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	399.1782 [M+Na] ⁺	-0.5	375.1808 [M-H]	0.0	*327.16; 312.14; 176.08; 161.06	<i>threo</i> -2-(5'-Hydroxy-4'-methoxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol
11	53.9/7.72	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	397.1626 [M+Na] ⁺	-0.3	373.1650 [M-H]	-0.3	#357.17; 339.16; 324.13; 297.11; 233.12; 215.11; 203.11; 188.08; 151.08; 137.06	4-Hydroxy-3,3',4'-trimethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-ol
12	54.1/7.92	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	413.1939 [M+Na] ⁺	-0.2			#373.19; 340.17; 217.12; 203.11; 177.09; 165.09; 151.08	<i>eritro</i> -2,3-[4',5':4'',5''-bis(Dimethoxybenzyl)]butan-1,4-diol
13	55.1/8.39	C ₁₆ H ₁₁ NO ₃	266.0815 [M+H] ⁺	-0.8	264.0666 [M-H]	+1.9	#251.06; 223.06; 195.07; 180.06; 167.07; 152.06; 140.06; *249.04; 221.05; 193.05; 165.06	Aristolactam AII
14	55.4/8.13	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	413.1943 [M+Na] ⁺	+0.7				<i>threo</i> -2,3-[4',5':4'',5''-bis(Dimethoxybenzyl)]butan-1,4-diol
15	56.7/8.65	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	397.1629 [M+Na] ⁺	-0.5			#357.17; 339.16; 324.14; 309.15; 217.17; 203.11; 201.09; 189.09; 187.08; 177.09; 165.09; 163.08; 161.06; 151.08; 135.04; 133.06; 131.05	<i>threo</i> -2-(4',5'-Methylenedioxybenzyl)-3-(4'',5''-dimethoxybenzyl)-butan-1,4-diol**
16	57.2/8.60	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	411.1782 [M+Na] ⁺	-0.5			#371.18; 353.17; 338.15; 311.13; 298.12; 291.13; 253.11; 233.12; 215.11; 205.12; 203.11; 188.08; 165.09; 151.08	3,3',4,4'-Tetramethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-ol
17	57.8/9.12	C ₁₈ H ₁₃ NO ₅	324.0873 [M+H] ⁺	+0.3			#309.06; 294.04; 279.06; 266.05; 264.04; 251.07; 248.08; 236.05; 223.08; 208.05; 195.08	9-Methoxyaristolactam I
18	59.0/9.38	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359.1490 [M+H] ⁺	-1.4			#341.14; 323.13; 293.12; 263.11; 235.11; 201.09; 187.08; 173.06; 161.06; 149.06; 135.04; 133.06; 131.05	Dihydrocubebin**
19	59.3- 59.8/ 9.17- 9.69	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	395.1470 [M+Na] ⁺	-0.2			#355.15; 337.14; 322.12; 279.14; 233.12; 215.11; 205.12; 201.09; 199.08; 189.09; 185.06; 177.06; 173.06; 165.09; 161.06; 151.08; 149.06; 135.04; 131.05	19a+19b : Interconvertible epimers of 3,4-dimethoxy-3,4-desmethylenedioxcubebin**
20	61.2/9.69	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	345.1698 [M+H] ⁺	-1.2			#327.16; 295.13; 263.11; 221.12; 203.11; 181.09; 165.09; 153.05; 151.08; 137.06; 133.06; 105.07	8,8'-Dimethyl-7,7'-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)tetrahydrofuran
21	61.4/10.2	C ₁₇ H ₁₁ NO ₄	294.0762 [M+H] ⁺	-1.4			#279.05; 251.06; 249.04; 221.05; 195.07; 193.05; 167.07; 139.05	Aristolactam I
22	61.7/9.84	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	345.1701 [M+H] ⁺	-0.3			#327.16; 295.13; 263.11; 221.12; 203.11; 181.09; 165.09; 153.05; 151.08; 137.06; 133.06; 105.07	8,8'-Dimethyl-7,7'-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)tetrahydrofuran

23	61.9- 62.2/ 9.94- 10.3	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	379.1158 [M+Na] ⁺	+0.0			#306.09; 291.10; 263.11; 261.09; 233.09; 203.06; 185.06; 173.06; 161.06; 149.06; 143.05; 135.04; 131.05; 115.05; 103.05	Interconvertible epimers of <i>trans</i> - cubebin: α -cubebin(23a)+ β - cubebin(23b)**
24	62.8/10.4	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	371.1505 [M+H] ⁺	+2.7			#353.14; 335.13; 321.11; 303.10; 293.12; 263.11; 177.09; 151.08; 135.04	Kusunokinin**
25	64.9/11.0	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	355.1179 [M+H] ⁺	-0.8			#337.11; 319.10; 307.09; 289.09; 279.10; 261.09; 259.07; 249.09; 231.08; 163.04; 161.06; 149.06; 135.04; 133.06; 131.05; 119.05; 103.05	Hinokinin**
26	65.6/10.8	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	359.1860 [M+H] ⁺	+0.6			#341.17; 309.15; 235.13; 221.12; 217.12; 203.11; 195.10; 181.09; 179.11; 171.08; 167.07; 165.09; 153.05; 151.08; 137.06; 133.06	Aristolignin**, ^s
27	65.9/10.8	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	359.1860 [M+H] ⁺	+0.6			#341.17; 309.15; 235.13; 221.12; 217.12; 203.11; 195.10; 181.09; 179.11; 171.08; 167.07; 165.09; 153.05; 151.08; 137.06; 133.06	Nectandrin A**, ^s
28	67.9/11.5	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	343.1545 [M+H] ⁺	+0.0	341.1390 [M-H] ⁻	+0.3	#325.14; 295.13; 293.12; 263.11; 221.12; 219.10; 203.11; 201.09; 191.11; 189.09; 165.09; 163.08; 151.04; 149.06; 137.06; 135.04; 133.07; 107.05; 105.07	Talaumidin**
29	69.5/11.9	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	373.2008 [M+H] ⁺	-1.9			#355.19; 235.13; 217.12; 207.14; 202.10; 191.11; 179.11; 176.08; 167.07; 165.09; 151.08; 139.07	8,8'-Dimethyl-7,7'-[3,4:3',4'- bis(dimethoxyphenyl)]tetrahydro-furan
30	70.0/11.4	C ₂₇ H ₄₆ O ₉	537.3041 [M+Na] ⁺	+0.2			#497.27; 353.27; 335.25; 261.22; 243.21; 233.23; 215.18; 189.16; 149.13; 135.12; 109.10	3-(Hexopyranosyloxy)-2-hydroxypropyl (9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoate
31	>70/11.8	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	317.2087 [M+H] ⁺	-1.9	293.2124 [M-H] ⁻	+2.4	#277.18; 107.09; 93.07; 79.05	Hydroxystearidonic acid
32	>70/12.4	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	319.2242 [M+Na] ⁺	-2.2	295.2277 [M-H] ⁻	+1.4	#279.23; 261.22; 243.21; 109.10; 95.09; 81.07	Hydroxylinolenic acid
33	>70/13.4	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	341.1386 [M+H] ⁺	-0.9			#323.13; 293.12; 265.12; 245.09; 219.10; 201.09; 189.09; 179.07; 171.08; 163.08; 159.08; 151.04; 149.06; 135.04; 133.06; 123.04; 105.07	8,8'-Dimethyl-7,7'-[3,4:3',4'- bis(methylenedioxy phenyl)]tetrahydrofuran

^sRetention times may be interchanged. Lignans with retention times 61.2/9.69 and 61.7/9.84 are stereoisomers.

Table 2. Chemical constituents tentatively identified in the F2 fraction rich in alkaloids/flavonoids by HPLC-ESI-MS/MS.

N ^o .	<i>t_r</i> (min)	FM	Ionized molecules and ion fragments (<i>m/z</i>)				Annotation	
			MS	Error	MS	Error		MS ² [positive (#) and negative (*) modes]
34	7.10/0.82	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0863	-3.0			#149.06; 137.06; 121.06; 103.05; 91.05; 77.04	Norsalsolinol
35	7.10/0.82	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0863	-3.0			#149.06; 148.07; 131.05; 120.08; 107.05; 103.05; 93.07; 91.05	Phenylalanine
36	7.20/0.82	C ₅ H ₅ N ₅	136.0619	-2.9			#119.04; 109.05; 94.04; 92.02	Adenine
37	7.20/1.70	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180.1033	+4.4			#163.07; 151.07; 145.06; 117.07; 115.05; 91.05	Salsolinol
38	7.50/2.07	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	274.1071	-2.9	272.0922	-0.4	#257.08; 239.07; 221.06; 213.05; 211.07; 164.07; 152.07; 147.04; 146.06; 138.05; 123.04; 118.06; 107.05; *243.06	Alternamine A: [1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6,7-diol]
39	8.00/1.39	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.1044	-0.7			#136.06; 119.03	Adenosine
40	25.9/3.67	C ₂₆ H ₃₁ NO ₁₂	550.1927	-0.4	548.1762	-1.1	#418.15; 256.10; 162.06; *254.08	1-(4-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline-hexose-pentose
41	27.5/4.09	C ₁₅ H ₁₃ NO ₄	272.0924	+0.4	270.0763	-1.1	#270.07; 257.07; 162.05; 144.04; 136.04; 135.04; 134.04; 123.04; 117.03; 116.05; 89.04; *268.06; 160.04; 134.02	1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline
42	29.2/4.40	C ₁₅ H ₁₃ NO ₃	256.0971	-1.2			#241.07; 162.05; 144.04; 135.04; 134.04; 116.05; 107.05	1-(4-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-3,4-dihydroisoquinoline
43	29.4/3.62	C ₈ H ₁₀ O ₃			153.0556	+2.6	*123.05; 122.04; 109.03; 108.02	Hydroxytyrosol
44	29.5/4.40	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1392	0.0	312.1239	+1.0	#298.11; 283.08; 176.07; 151.08; 137.06	1,2-Dihydronorreticuline

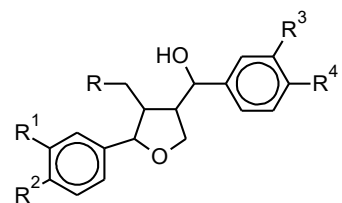
45	29.8/4.50	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314.1751 [M ⁻]	-1.6			#299.11; 271.13; 269.12; 239.11; 237.09; 211.11; 209.10; 192.10; 175.08; 145.06; 143.05; 137.06; 115.05; 107.05	Magnocurarine
46	31.3/4.71	$C_{17}H_{19}NO_3$	286.1440 [M+H] ⁺	-1.0			#269.12; 254.09; 237.09; 209.10; 178.09; 175.07; 163.07; 145.06; 143.05; 121.06; 107.05	Coclaurine
47	31.5/4.76	$C_{18}H_{21}NO_3$	300.1595 [M+H] ⁺	-1.7			#283.13; 271.13; 269.12; 237.09; 209.09; 192.10; 175.08; 145.06; 143.05; 121.06; 107.05	<i>N</i> -Methyl coclaurine
48	31.6/4.61	$C_{23}H_{29}NO_8$	448.1963 [M+H] ⁺	-1.8			#286.14; 269.12; 255.10; 237.08; 209.09; 161.06; 107.05	<i>N</i> -Methylnorcoclaurine-hexose
49	32.3/4.87	$C_{20}H_{26}NO_4^+$	344.1865 [M ⁻]				#301.14; 299.13; 269.12; 267.10; 175.08; 151.08; 143.05; 137.06	Tembetarine
50	32.6/4.97	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.1710 [M ⁻]	+1.5			#311.13; 297.11; 282.09; 265.09; 237.09	Magnoflorine
51	33.1/4.35	$C_{33}H_{40}O_{20}$	757.2174 [M+H] ⁺	-2.2	755.2034 [M-H] ⁻	-0.1	#449.11; 287.06; *593.15; 285.04	Kaempferol-hexose-ramnose-hexose
52	33.6/5.07	$C_{19}H_{23}NO_4$	330.1707	+0.6			#299.13; 267.10; 239.11; 192.10; 177.08; 175.07; 151.07; 143.05; 137.06	Reticuline
53	33.9/4.45	$C_7H_6O_3$			137.0245 [M-H] ⁻	+4.4	*136.02; 108.02; 93.03	Hydroxybenzoic acid
54	34.3/5.34	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314.1753 [M ⁻]	-0.9			#269.12; 237.09; 175.07; 143.05; 137.06; 107.05	Lotusine
55	34.6/4.56	$C_{21}H_{28}O_{13}$			487.1459 [M-H] ⁻	+1.6	*341.11; 325.09; 307.08; 289.08; 265.07; 247.06; 235.05; 205.05; 177.06; 163.04; 145.03; 119.05	<i>p</i> -coumaric acid dihexoside
56	35.1/4.76	$C_{15}H_{18}O_8$			325.0931 [M-H] ⁻	+2.5	*289.08; 265.07; 259.06; 235.06; 205.05; 187.04; 177.06; 163.04; 161.06; 145.03; 119.05	<i>p</i> -coumaric acid hexoside
57	35.4/5.34	$C_{14}H_{21}NO_2$	236.1648 [M ⁺]	-1.3			#219.14; 201.13; 177.09; 173.13; 163.08; 159.08; 149.06; 145.06; 137.06; 131.05; 123.04; 117.07; 103.05	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -methyl-affineine
58	36.0/5.39	$C_{19}H_{22}NO_3^+$	312.1601 [M ⁻]	+0.3			#294.15; 282.14; 279.12; 267.10; 249.04; 239.11; 219.08; 217.06; 207.08; 189.07; 179.09	<i>N</i> -Methyl pachyconfine
59	36.7/5.65	$C_{21}H_{26}NO_4^+$	356.1858 [M ⁻]	-1.1			#311.13; 296.10; 279.10; 264.08; 248.08	Menisperine

60	37.2/5.81	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂ ⁺	296.1650 [M] ⁻	-0.3			#251.11; 236.08; 219.08; 191.09	Annonamine
61	37.4/5.02	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	743.2028	-0.9	741.1892	+1.9	#449.11; 287.06; *579.13; 285.04	Kaempferol-hexose-pentose-hexose
62	37.4/5.02	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	743.2028 [M+H] ⁺	-0.9	741.1892 [M-H] ⁻	+1.9	#465.10; 303.05; *595.13; 301.03	Quercetin-hexose-pentose-ramnose
63	37.6/5.02	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	627.1559 [M+H] ⁺	-0.3	625.1407 [M-H] ⁻	+0.3	#465.10; 447.09; 429.08; 303.05	Quercetin-hexose-hexose
64	38.0/5.08	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₉	713.1927 [M+H] ⁺	-0.3	711.1775 [M-H] ⁻	+0.3	#581.15; 449.11; 431.10; 419.09; 287.05 *579.13; 561.12; 285.04	Kaempferol-hexose-pentose-pentose
65	38.3/5.13	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	597.1461 [M+H] ⁺	+0.8	595.1304 [M-H] ⁻	+0.8	#465.10; 447.09; 435.09; 429.08; 417.08; 303.05	Quercetin-hexose-pentose
66	38.9/5.18	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.1871 [M+H] ⁺	+0.2	579.1724 [M-H] ⁻	+1.7	#435.12; 419.13; 417.13; 273.08; 255.08; *271.06; 227.07; 177.02; 151.00; 119.05; 107.01	Naringenin-ramnose-hexose
67	39.3/5.28	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	727.2091 [M+H] ⁺	+0.7	725.1935 [M-H] ⁻	+0.8	#595.16; 581.15; 449.11; 419.10; 287.05	Kaempferol-hexose-pentose-ramnose
68	39.5/5.25	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1605 [M+H] ⁺	-1.1	609.1461 [M-H] ⁻	+0.8	#449.11; 431.09; 287.06; *447.09; 285.04	Kaempferol-hexose-hexose
69	39.8/5.36	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1604 [M+H] ⁺	-1.3	609.1460 [M-H] ⁻	+0.6	#465.10; 303.05	Quercetin-hexose-ramnose
70	40.1/5.34	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581.1511 [M+H] ⁺	+0.9	579.1357 [M-H] ⁻	+1.2	#449.11; 431.10; 287.06	Kaempferol-hexose-pentose
71	41.7/5.60	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1660 [M+H] ⁺	-0.5	593.1511 [M-H] ⁻	+0.8	#449.11; 287.06	Kaempferol-hexose-ramnose
72	43.1/5.80	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1085 [M+H] ⁺	+0.2	447.0936 [M-H] ⁻	+2.0	#258.05; 241.05; 213.05; 165.02; 153.02; 137.02; 121.03; 109.03; *285.04; 255.03; 227.03; 151.00	Kaempferol-hexose
73	44.1/6.01	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.1862 [M+H] ⁺	-1.4	579.1721 [M-H] ⁻	+1.2	#435.13; 419.14; 417.3; 273.08; 153.02; *271.06; 227.07; 177.02; 151.00; 119.05; 107.01	Naringenin-hexose-ramnose

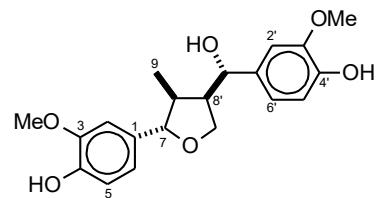
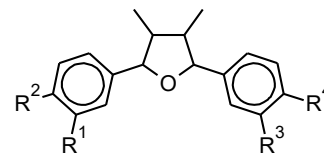
Table 3. Acute effects of the infuse of *Aristolochia triangularis* on blood glucose levels (mg/dL) in OGTT

Groups					
Time (min)	Control	Inf-L-At (62.5 mg/kg)	Inf-L-At (125 mg/kg)	Inf-L-At (250 mg/kg)	Glibenclamide (100 mg/kg)
0	95.6 ± 3.0	86.5 ± 2.8	88.2 ± 2.0	92.4 ± 4.3	92.4 ± 1.6
15	208.8 ± 5.2	146.8 ± 5.0***	151.2 ± 4.5***	158.2 ± 8.8***	152.2 ± 3.4***
30	207.2 ± 2.3	148.6 ± 3.4***	155.8 ± 3.7***	152.6 ± 3.3***	150.6 ± 4.7***
60	196.2 ± 2.6	127.8 ± 2.0***	129.8 ± 1.6***	142.2 ± 6.9***	131.2 ± 3.0***
180	110.4 ± 5.4	91.8 ± 5.5***	97.8 ± 1.3*	102.0 ± 3.8	85.2 ± 4.4***
AUC	29850	21320	21290	22040	23280

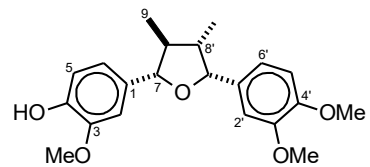
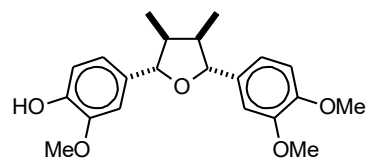
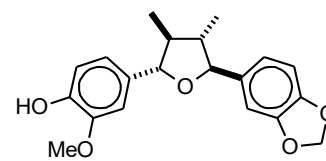
Values are expressed as mean ± SEM; n=5 for this treatment. *p ≤0.05; **p ≤0.01; ***p ≤0.001, statistically significant differences when compared to the control group.



	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
3	OH	OMe	OH	OMe	OH
8	OH	OCH ₂ O		OMe	OH
11	H	OMe	OH	OMe	OMe
16	H	OMe	OMe	OMe	OMe

**7**

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
20	OMe	OH	OMe	OH
22	OMe	OH	OMe	OH
29	OMe	OMe	OMe	OMe
33		OCH ₂ O	OCH ₂ O	

**26****27****28**

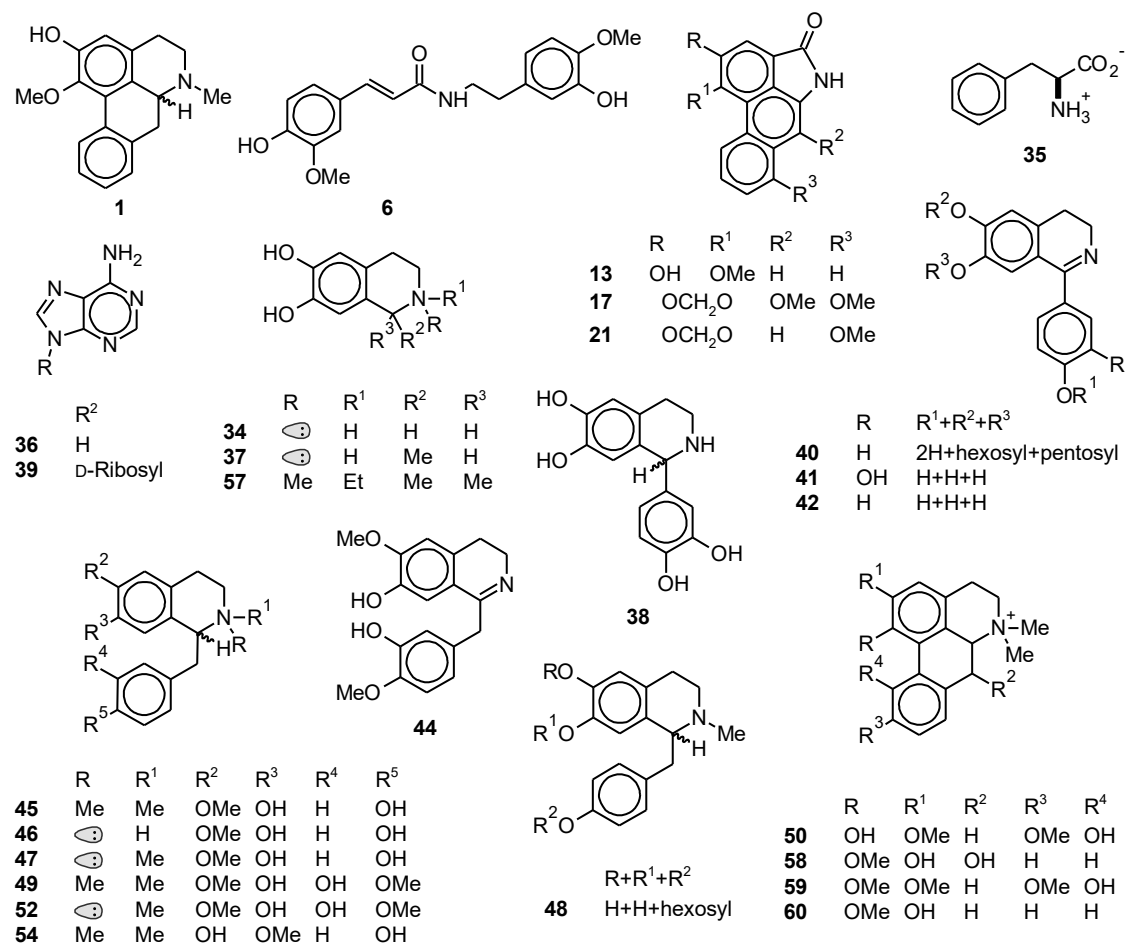


Fig. 3. Alkaloids and other nitrogenous compounds tentatively identified in the tea of *A. triangularis* leaves.

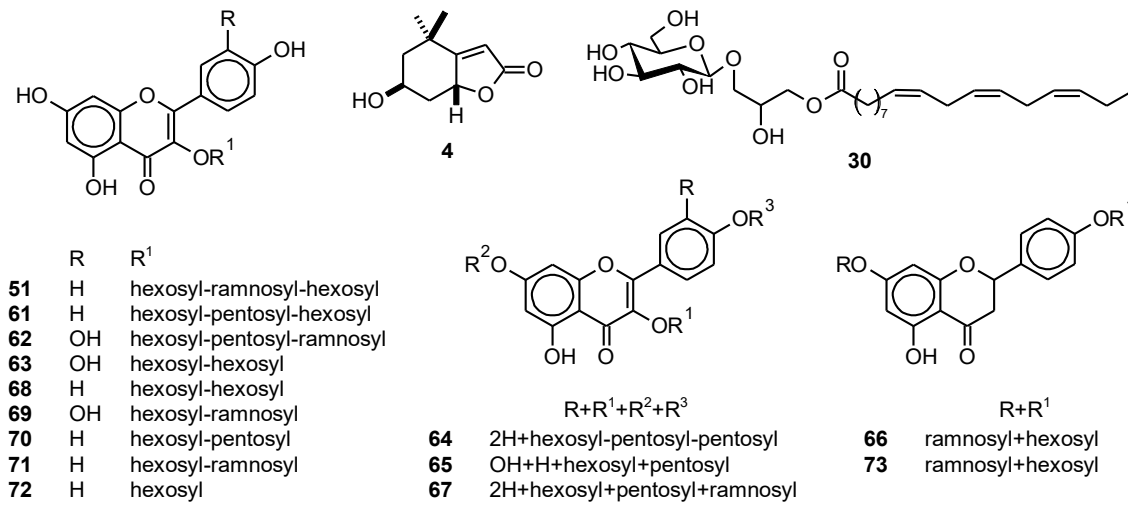


Fig. 4. Flavonoids and other compounds tentatively identified in the tea of *A. triangularis* leaves.

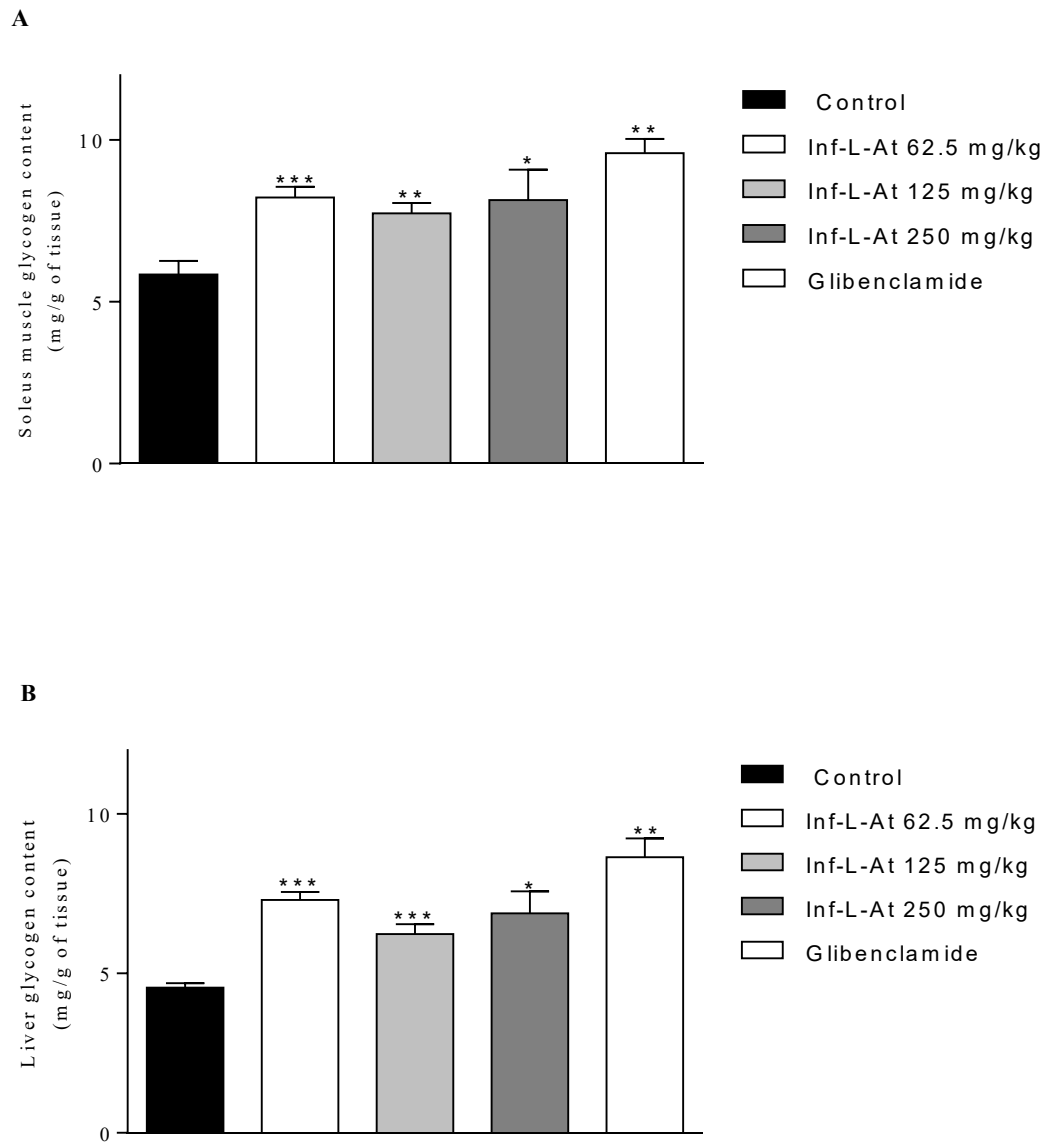


Fig. 5. Effect of the infuse of *Aristolochia triangularis* on muscular (A) and liver (B) glycogen content after OGTT. The values are expressed as mean \pm SEM; $n = 5$ for each group. Statistically significant difference when compared to the control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

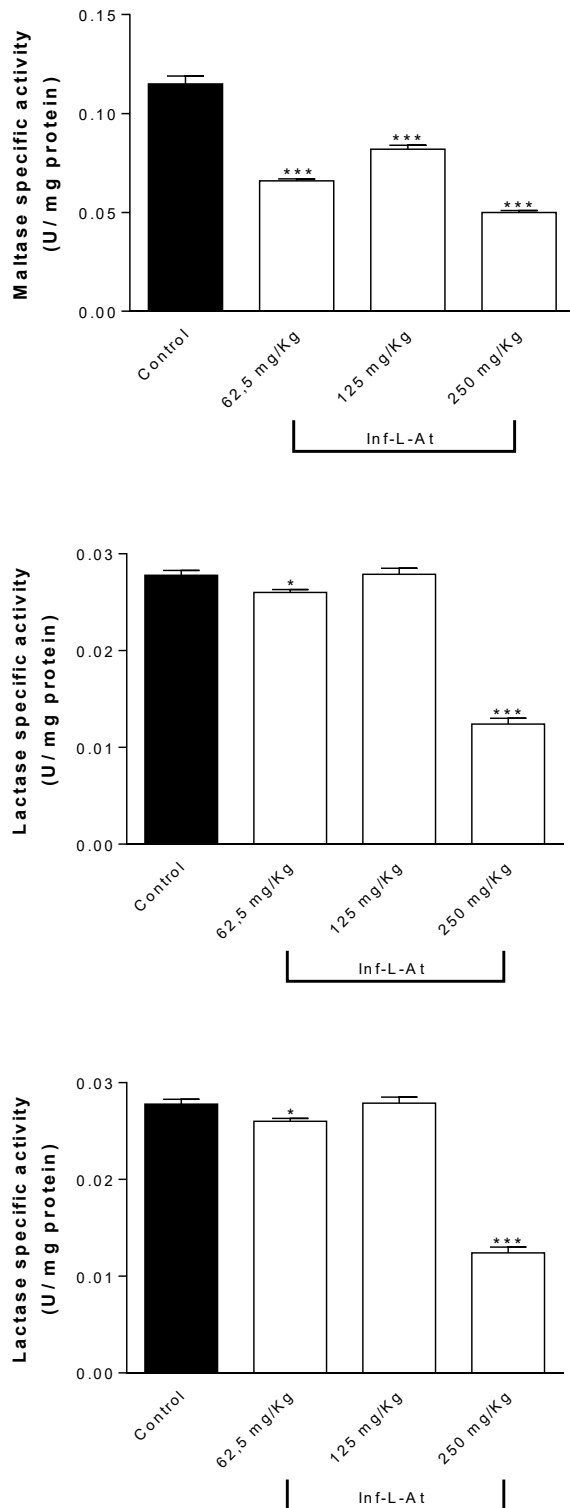


Fig. 6. Effect of Inf-L-At in the activity of maltase, lactase and sucrase after OGTT. The values are expressed as mean \pm SEM; $n = 5$ for each group. Statistically significant difference when compared to the control. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

References

- Al-Ishaq, R. K., Abotaleb, M., Kubatka, P., Kajo, K., & Büsselberg, D. (2019). Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules*, 9(9), 430. doi.org/10.3390/biom9090430
- Alegransi, C., Cunha, A., Heringer, T. A., Vincensi, T. M., Dias, T. O., Goulart, J. S., Ribeiro, G. M., Rodrigues, E. E. C., Cattaneo, R., 2021. Avaliação do efeito antioxidante de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham.) em eritrócitos de pacientes com doenças neurodegenerativas. *Res., Soc. Dev.* 10, 5, e58710514903, p. 1–9. doi:10.33448/rsd-v10i5.14903
- Alkhalidy, H.; Moore, W.; Wang, Y.; Luo, J.; McMillan, R.P.; Zhen, W.; Zhou, K.; Liu, D. The Flavonoid Kaempferol Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetes by Suppressing Hepatic Glucose Production. *Molecules* 2018, 23, 2338. doi: 10.3390/molecules23092338
- Ashcroft, F. M., & Gribble, F. M. (2000). Tissue-specific effects of sulfonylureas. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 14(4), 192–196. doi:10.1016/s1056-8727(00)00081-7
- Amat, A. G., Yajia, M. E., Gonzalez, C. F., Lorca, G. L., Gonzalez, F. S., Riglos, A. G., Veron, J. R., 2002. Evaluation of cytological parameters induced by aqueous extracts of seven plants used as antihypertensive agents in Argentine folk medicine. *Acta Farm. Bonaerense*. 21, 1, p. 37–42.
- American Diabetes Association. 2011. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, v.34, supl.1, p. S62-S69, 2011.
- Anjana, R. M., Unnikrishnan, R., Mugilan, P., Jagdish, P. S., Parthasarathy, B., Deepa, M., Loganathan, G., Kumar, R. A., Rahulashankiruthiyayan, T., Sankari, G. U., Venkatesan, U., Mohan, V., Rani, C. S. S., 2018. Causes and predictors of mortality in Asian Indians with and without diabetes-10 year follow-up of the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES – 150). *Plos One*. 13, 7, p 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0197376

- Boas, G. R. V., Araújo, F. H. S., Marcelino, J. M., Castro, L. H. A., Silveira, A. P. S., Nacer, R. S., Souza, F. R., Cardoso, C.A.L., Lacerda, R. B., Guterres, Z. R., Oesterreich, S. A. (2018). Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects. *Food & Function*, 9(7), 3707–3717. doi:10.1039/c8fo01017j
- Brahmachari, G., 2016. *Discovery and development of antidiabetic agents from natural products*, first ed. Elsevier, Amsterdam.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014, Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 May. 2014.*
- Bule, M.; Abdurahman, A.; Nikfar, S.; Abdollahi, M.; Amini, M. Antidiabetic effect of quercetin: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Food Chem. Toxicol.* 2019, 125, 494–502. doi: 10.1016/j.fct.2019.01.037
- Chatterjee, S., Khunti, K., Davies, M. J., 2017. Type 2 diabetes. *Lancet.* 389, 10085, p. 2239–2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2
- Chen, H., Zhang, M., 2021. *Structure and health effects of natural products on diabetes mellitus*, first ed. Springer, Singapore.
- Ciccía, G., Coussio, J., Mongelli, E., 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J. Ethnopharmacol.* 72, p. 185–189. doi:10.1016/S0378-8741(00)00241-5
- Coskun, O.; Kanter, M.; Korkmaz, A.; Oter, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* 2005, 51, 117–123. 10.1016/j.phrs.2004.06.002

- da Silva, J. D. A., Nogueira, C. R., Vieira, M. C., Heredia-Vieira, S. C., Barufatti, A., Crispim, B. A., Francisco, L. F. V., Viana, L. F., Cardoso, C. A. L., 2019. Toxicological properties of an aqueous extract of *Aristolochia triangularis* leaves, using the brine shrimp lethality and *Allium cepa* bioassays. *Cienc. Rural.* 49, 8, e20190091, p. 1–7. doi:10.1590/0103-8478cr20190091
- Dahlqvist, A. (1984). Assay of intestinal disaccharidases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 44(2), 169–172. doi:10.3109/00365518409161400
- de Souza, V. V., Spadeto, M., Guedes, R. A., Clarindo, W. R., Carvalho, C. R., Severi, J. A., Souza, T. S., 2020. Toxicity of *Aristolochia* decoction: a relevant herbal in folk medicine. *Caryologia.* 73, 3, p. 111–120. doi:10.13128/caryologia-880
- Eid, H.M.; Martineau, L.C.; Saleem, A.; Muhammad, A.; Vallerand, D.; Benhaddou-Andaloussi, A.; Haddad, P.S. Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 991–1003. doi: 10.1002/mnfr.200900218
- Félix, J. M., Bertoncello, L. A., Alves, M. C. do A., Pedroso, T. F. M., dos Santos, R. C., Formagio, A. S. N., Chaves, V. C., Reginatto, F. H., Trichez, V. D. K. (2020). Effects of *Bidens gardneri* Baker leaves aqueous extract in glucose homeostasis of rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110185. doi:10.1016/j.biopha.2020.110185
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M. S. J., 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. *J. Ethnopharmacol.* 125, p. 108–144. doi:10.1016/j.jep.2009.05.028

- Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D. E., & Leonti, M. (2009). Ethnopharmacological field studies: A critical assessment of their conceptual basis and methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(1), 1–17. doi:10.1016/j.jep.2009.03.043
- Hu, S-L., Zhang, H-Q., Chan, K., Mei, Q-X., 2004. Studies on the toxicity of *Aristolochia manshuriensis* (Guanmuton). *Toxicology*. 198, 1–3, p. 195–201. doi:10.1016/j.tox.2004.01.026
- International Diabetes Federation. 2017. Atlas: Eighth edition. Disponível em: <<https://diabetesatlas.org/en/>> Acesso em: 03 jan 2020.
- Hsu, Y. J., Lee, T. H., Chang, C. L. T., Huang, Y. T., & Yang, W. C. (2009). Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. *Journal of ethnopharmacology*, 122(2), 379-383.
- Karan, S. K., Mishra, S. K., Pal, D., Monda, A. (2012). Isolation of β -sitosterol and evaluation of antidiabetic activity of *Aristolochia indica* in alloxan-induced diabetic mice with a reference to in-vitro antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7). doi:10.5897/jmpr11.973.
- Kappel, V. D., Pereira, D. F., Cazarolli, L. H., Guessser, S. M., Da Silva, C. H. B., Schenkel, E. P., Reginatto, F. H., Silva, F. R. (2012). Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. *Molecules*, 17(6), 6754-6768. doi:10.3390/molecules17066754
- Kappel, V. D., Cazarolli, L. H., Pereira, D. F., Postal, B. G., Zamoner, A., Reginatto, F. H., & Silva, F. R. M. B. (2013). Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(8), 1179–1186. doi:10.1111/jphp.12066
- Kuo, P.-C., Li, Y.-C., & Wu, T.-S. (2012). Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* (馬兜鈴 *mǎ dōu líng*) species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(4), 249–266. doi:10.1016/s2225-4110(16)30111-0

- Leitão, G. G., Menezes, D. L. S. M., Kaplan, M. A. C., Craveiro, A. A., Alencar, J. W., 1991. Essential oils from Brazilian *Aristolochia*. *J. Essent. Oil. Res.* 3, 6, p. 403–408. doi:10.1080/10412905.1991.9697974.
- Lin, W., Fu, H-Z., Hano, Y., Nomura, T., 1997. Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (I). *J. Chin. Pharm. Sci.* 6, 1, p. 8–13. <http://www.jcps.ac.cn/EN/Y1997/V6/I1/8>.
- Lopes, L. M. X., Bolzani, V. S., Trevisan, L. M. V., Grigolli, T. M., 1990. Terpenes from *Aristolochia triangularis*. *Phytochemistry.* 29, 2, p. 660–662. doi:10.1016/0031-9422(90)85139-7.
- Lopes, L. M. X., Nascimento, I. R., da Silva, T., 2001. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: Mohan R. M. M., editor. *Research Advances in Phytochemistry*, v. 2. Kerala: Global Research Network. p. 19–108.
- Martin, G. M., Kandasamy, B., DiMaio, F., Yoshioka, C., & Shyng, S. L. (2017). Anti-diabetic drug binding site in KATP channels revealed by Cryo-EM. *bioRxiv*, 172908. doi:10.1101/172908
- Mesa, A. M., Guzman, J. G., Cravioto, R. O., de la Torre, J. C., 1950. Antibiotic properties of some extracts of higher plants. *Ciencia e Invest.* 6, p. 471–476.
- Michl, J., Kite, G.C., Wanke, S., Zierau, O., Vollmer, G., Neinhuis, C., Simmonds, M.S.J., Heinrich, M., 2016. LC-MS- and ¹HNMR-based metabolomic analysis and in vitro toxicological assessment of 43 *Aristolochia* species. *J. Nat. Prod.* 79, 1, p. 30–37. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00556.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussio, J., Ciccía, G., 1997. The potential effects of allelopathic mechanisms on plant species diversity and distribution determined by the wheat rootlet growth inhibition bioassay in South American plants. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70, p. 83–89.

- Mongelli, E., Pampuro, S., Coussio, J., Salomon, H., Ciccía, G., 2000. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71, 1–2, p. 145–151. doi:10.1016/S0378-8741(99)00195-6.
- Muschietti, L., Martino, V., Ferraro, G., Coussio, J., Segura, L., Cartañá, C., Cañiqueral, S., Adzet, T., 1996. The anti-inflammatory effect of some species from South America. *Phytother. Res.* 10, p. 84–86. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199602)10:1<84::AID-PTR779>3.0.CO;2-C.
- Navale, A. M., & Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical reviews*, 8(1), 5-9. doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2014). *Principios de bioquímica de Lehninger*, 6ª ed. Porto Alegre.
- Nogueira, C. R., da Silva, J. D. A., Vieira, M. C., Cardoso, C. A. L., de Carvalho, R. A., Amaral, C. S. T., Amaral, A. C., 2021. Cytotoxicity and the bioconversion strategy of *Aristolochia* spp. *Arq. Inst. Biol.* 87, e00622019, p. 1–6. doi:10.1590/1808-1657000622019.
- Nogueira, C. R., Lopes, L. M. X., 2012. Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*. *Quim. Nova.* 35, 4, p. 780–782. doi:10.1590/S0100-40422012000400024.
- Oliveira, D. G., Prince, K. A., Higuchi, C. T., Santos, A. C. B., Lopes, L. M. X., Simões, M. J. S., Leite, C. Q. F., 2007. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28, 2, p.165–169.
- Oliveira, S. Q., Kratz, J. M., Chaves, V. C., Guimarães, T. R., Costa, D. T. M., Dimitrakoudi, S., Vontzalidou, A., Bordignon, S. A. L., Simionato, C. P., Steindel, M., Reginatto, F. H., Simões, C. M. O., Schenkel, L. P., 2019. Chemical constituents and pharmacology properties of *Aristolochia triangularis*: a south brazilian highly-consumed botanical with multiple bioactivities. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91, 3, e20180621, 1–12. doi:10.1590/0001-3765201920180621.
- Pedroso, T. F. M de, Bonamigo, T. R., da Silva, J., Vasconcelos, P., Félix, J. M., Cardoso, C. A. L., Souza, R. I. C., Santos, A. C., Volobuff, C. R. F., Formagio, A. S. N., Trichez, V. D. K.

- (2019). Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation, and anticholinesterase effects in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 1383–1392. doi:10.1016/j.biopha.2019.01.005
- Pereira, A. O., Avila, J. M., do Carmo, G., Siqueira, F. S., Campos, M. M. A., Back, D. F., Morel, A. F., Dalcol, I. I., 2018. Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. *Ind. Crop. Prod.* 121, p. 461–467. doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.052.
- Priestap, H. A., Bandoni, A. L., Neugebauer, M., Rücker, G., 1990. Investigation of the essential oils from *Aristolochia triangularis*. *J. Essent. Oil. Res.* 2, 3, p. 95–98. doi:10.1080/10412905.1990.9697836.
- Rücker, G., Langmann, B., 1978. 3,4-Dimethoxy-3,4-demethylenedioxcubebin, a new lignan from *Aristolochia triangularis*. *Tetrahedron Lett.* 19, 5, p.457–458. doi:10.1016/S0040-4039(01)91453-4.
- Rücker, G., Langmann, B., Siqueira, N. S., 1981. Constituents of *Aristolochia triangularis*. *Planta Med.* 41, 2, p. 143–149. doi:10.1055/s-2007-971691.
- Schvartaman, J. B., Krimer, D. B., Azorero, R. M., 1977. Cytological effects of some medicinal plants used in the control of fertility. *Experientia.* 33, 5, 663–665. doi:10.1007/BF01946562.
- Silva, J. D. A. D., Nogueira, C. R., Vieira, M. D. C., Heredia-Vieira, S. C., Barufatti, A., Crispim, B. D. A., Francisco, L. F. V., Viana, L. F., Cardoso, C. A. L. (2019). Toxicological properties of an aqueous extract of *Aristolochia triangularis* leaves, using the brine shrimp lethality and *Allium cepa* bioassays. *Ciência Rural*, 49(8). doi:10.1590/0103-8478cr20190091.
- Sulyman, A. O., Akolade, J. O., Sabiu, S. A., Aladodo, R. A., Muritala, H. F., 2016. Antidiabetic potentials of ethanolic extrac of *Aristolochia ringens* (Vahl.) roots. *J. Ethnopharmacol.* 182, p. 122–128. doi:10.1016/j.jep.2016.02.002.

- Trojan-Rodrigues, M., Alves, T. L. S., Soares, G. L. G., Ritter, M. R., 2012. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 139, 1, p. 155–163. doi:10.1016/j.jep.2011.10.034.
- Varshney, R., Gupta, S., & Roy, P. (2017). Cytoprotective effect of kaempferol against palmitic acid-induced pancreatic β -cell death through modulation of autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 448, 1–20. doi:10.1016/j.mce.2017.02.033
- World Health Organization, 2021. Diabetes. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes> (accessed 08 July 2021).
- World Health Organization. (2016). Global report on diabetes. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204871>.
- Zhou, Q., Pei, J., Poon, J., Lau, A. Y., Zhang, L., Wang, Y., Liu, C.; Huang, L., 2019. Worldwide research trends on aristolochic acid (1957-2017): Suggestions for researchers. *Plos One.* 14, 5, e0216135, p. 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0216135.

7. ANEXOS

7.1. Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 14 de Agosto de 2019.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Investigação do potencial antidiabético de *Aristolochia triangularis* Cham. (Aristolochiaceae)**”, registrada sob o protocolo de nº 13/2019, sob a responsabilidade de *Cláudio Rodrigo Nogueira* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 03/05/2019.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	10/10/2019 a 28/02/2023
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus - Wistar</i>
<i>Nº de animais</i>	292
<i>Peso/idade</i>	180-200 g / 40-50 dias
<i>Sexo</i>	<i>Machos</i>
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Cordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa
Góes, 1761 – Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br