

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

**Análise antinociceptiva, antiartrítica e de toxicidade de extratos das folhas de *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl**

**LIDIANE SCHULTZ BRANQUINHO**

**Dourados - MS  
2020**

LIDIANE SCHULTZ BRANQUINHO

Análise antinociceptiva, antiartrítica e de toxicidade de extratos das folhas de *Doliocarpus dentatus*  
(Aubl.) Standl

Área do CNPq: Etnofarmacologia (2.10.06.00-8)

Exame de Defesa 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: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Candida Aparecida Leite Kassuya  
Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho

Dourados - MS  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B817a Branquinho, Lidiane Schultz

Análise antinociceptiva, antiartrítica e de toxicidade de extratos das folhas de *Dolioscarpus dentatus* (Aubl.) Standl [recurso eletrônico] / Lidiane Schultz Branquinho. -- 2021.  
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Cândida Aparecida Leite Kassuya.

Coorientadora: Saulo Euclides Silva Filho.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

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

1. Dor. 2. Inflamação articular. 3. Toxicidade. 4. Genotoxicidade. 5. Ácido betulínico. I. Kassuya, Cândida Aparecida Leite. II. Silva Filho, Saulo Euclides . III. 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 **LIDIANE SCHULTZ BRANQUINHO** ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos quatorze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 08 horas, em sessão pública, realizou-se por videoconferência a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "**Análise antinociceptiva, antiartrítica e de toxicidade de extratos das folhas de *Dolioscarpus dentatus* (Aubl.) Standl.**" apresentada pela aluna **Lidiane Schultz Branquinho**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cândida Aparecida Leite Kassuya - PPGCS/UFPGD (presidente), Dr.<sup>a</sup> Sara Santos Bernardes – UFPGD/UFMG, Dr. Marcio Eduardo de Barros - UFPGD, Dr.<sup>a</sup> Aline Lima de Barros – UEMS e Dr.<sup>a</sup> Francielli Maria de Souza Silva Comar - UEM. Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata 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 a candidata considerada APROVADA, fazendo *jus* ao título de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. O membro da banca abaixo-assinado atesta que todos os membros participaram de forma remota<sup>1</sup> desta defesa de tese, considerando a candidata APROVADA, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelo membro da Comissão Examinadora.

Dr.<sup>a</sup> Cândida Aparecida Leite Kassuya - PGCS/UFPGD  
Dr.<sup>a</sup> Sara Santos Bernardes - UFPGD/UFMG (participação remota)  
Dr. Marcio Eduardo de Barros - UFPGD (participação remota)  
Dr.<sup>a</sup> Aline Lima de Barros – UEMS (participação remota)  
Dr.<sup>a</sup> Francielli Maria de Souza Silva Comar – UEM (participação remota)

Dourados, 14 de dezembro de 2020.

<sup>1</sup> 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.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
com todo meu amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTO(S)**

*Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino e me mostrar que a Sua vontade é boa, perfeita e agradável. Obrigada Senhor pelo seu cuidado diário e o seu amor demonstrado na cruz do calvário.*

*Aos meus pais Antônio Moreno Branquinho e Beatriz Leani Schultz por todo amor e carinho que tem comigo, por me apoiarem nas decisões mais importantes da minha vida. Obrigada por todos os ensinamentos e suporte e por me guiarem sempre no caminho do bem. Amo vocês mais que tudo!*

*À minha família pelo incentivo e orações. Por se orgulharem de mim e por fazer dessa conquista, a de vocês também. Que eu possa ser exemplo de determinação e resiliência na vida de vocês.*

*À minha querida orientadora Dra. Candida A. L. Kassuya por acreditar em mim desde o começo e por todo suporte, apoio, paciência e carinho durante esses anos. Um exemplo de ser humano e profissional, uma verdadeira inspiração na minha vida! Obrigada por todos os ensinamentos, amizade e por tornar real esse sonho.*

*Ao meu co-orientador Dr. Saulo E. Silva Filho por todos os ensinamentos e suporte durante os experimentos e a escrita desse trabalho. Aprendi muito com você. Obrigada!*

*Aos colegas do laboratório CALK por todo aprendizado, paciência e colaboração nos experimentos. Vivemos grandes momentos nesse tempo que passamos juntos e essa parceria foi fundamental para chegar até aqui. Obrigada a todos, foi um prazer compartilhar experiências com vocês!*

*À Dra. Cláudia A. L. Cardoso e à Dra. Maria Helena Verdan, grandes parceiras e colaboradoras que tive o prazer de trabalhar. Obrigada por todo suporte e ensinamentos.*

*Aos professores membros da banca e suplentes, Dra. Aline L. de Barros, Dra. Arielle C. Arena, Dra. Francielli Maria de Souza Silva-Comar, Dr. Marcio Eduardo de Barros, Dra.*

*Maria Helena Verdan e Dra. Sara Santos Bernardes pela disponibilidade e contribuição para enriquecer nosso trabalho. Sinto um verdadeiro “Girl Power” pela presença de mulheres inspiradoras nesse momento da minha vida!*

*Aos professores e técnicos da Faculdade de Ciências da Saúde por todo suporte, conhecimento e ajuda que contribuíram para a realização deste trabalho e minha formação profissional.*

## EPÍGRAFE

Muita gente pensa que é preciso morrer  
para se encontrar com Deus. Outros chegam  
ao absurdo de duvidar da sua existência.  
Já eu, consigo enxergá-lo por todos os lados.

(RAFAEL MAGALHÃES)



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cascata do ácido araquidônico e outras vias que compreendem a resposta inflamatória	20
Figura 3 – Pata direita com artrite 21 dias após a indução por CFA	26
Figura 3 – Classificação dos cometas de acordo com níveis de danos no DNA	31
Figura 4 – Folhas de <i>D. dentatus</i>	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-HT	Serotonina
A $\delta$	A delta
AA	Ácido araquidônico
ACF	Adjuvante completo de Freund
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Ácido betulínico
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
COX	Cicloxygenase
COX-2	Cicloxygenase-2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DL50	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
EADd	Extrato aquoso das folhas de <i>Doliocapus. dentatus</i>
EEDd	Extrato etanólico das folhas de <i>Doliocarpus dentatus</i>
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
ESI	Ionização por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
GCs	Glicocorticoides ou esteroides
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GNPS	Rede Mundial de Material Molecular de Produtos Naturais
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MS	Ministério da Saúde

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5- difenil brometo de tetrazolium
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS/EDTA	Solução salina tamponada que contém ácido etilenodiamino tetra-acético
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio de cultura de células Roswell Park Memorial Institute 1640
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TxA <sub>2</sub>	Tromboxanos
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UHPLC-HRMS	Cromatografia líquida de ultra eficiência

## **Análise antinociceptiva e antiartrítica e potencial de toxicidade do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. *in vivo***

### **RESUMO**

Vários modelos experimentais são utilizados para estudar o processo inflamatório e a dor associada, sendo de importante relevância para a descoberta de novos medicamentos. As plantas medicinais são fontes úteis para desenvolver novas terapias farmacológicas devido aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos convencionais. *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae) é utilizada tradicionalmente para o alívio da dor inflamatória, mas a literatura relata poucas evidências do efeito analgésico e anti-inflamatório, bem como seu potencial toxicológico. Dessa forma, o objetivo do estudo foi determinar a atividade antinociceptiva, antiartrítica e determinar o potencial tóxico do extrato aquoso (EADd) e etanólico (EEDd) das folhas de *D. dentatus* em modelos experimentais *in vivo*. Os compostos do EADd foram identificados por UHPLC-HRMS (cromatografia líquida de ultra eficiência). Para a realização dos ensaios foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas, e camundongos machos C57BL/6. A dose oral de 17 mg/kg de EADd foi calculada de acordo com o uso etnofarmacológico e as doses de 30, 100 e 300 mg/kg foram selecionadas para serem testadas em modelos experimentais de dor inflamatória induzidas por formalina e ácido acético. EADd (100, 1000 e 2000 mg/kg) foi testado em camundongos nos testes de cometa, micronúcleo e fagocitose. Doses de 30, 100 e 300 mg/kg v.o. de EEDd foram utilizadas nos modelos de dor induzida por formalina e ácido acético. EEDd (100 e 300 mg/kg) também foi testado nos ensaios de inflamação crônica com adjuvante completo de Freund (CFA) e inflamação articular induzido por zymosan. Ácido betulínico 0,3, 3 e 30 mg/kg e EEDd 100 e 300 mg/kg foram usadas no modelo de peritonite induzida por zymosan. No ensaio de viabilidade celular *in vitro* (MTT), o EEDd foi testado nas doses 3, 10, 30 e 90 µg/mL. No teste de toxicidade aguda foram administradas em dose única via oral 500, 1000 e 2000 mg/kg do EEDd. Doses de 75, 150 e 300 mg/kg EEDd foram administradas no teste de toxicidade subaguda durante 28 dias e parâmetros comportamentais foram analisados. Os tratamentos orais com EADd e EEDd inibiram significativamente a sensibilidade nociceptiva na fase neurogênica e inflamatória do teste da formalina, diminuíram a hipersensibilidade ao frio e também preveniu o comportamento nociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No modelo de CFA, o tratamento oral durante 21 dias com EEDd inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica, o edema e a resposta ao frio. Do mesmo modo, o

EEDd preveniu a inflamação articular (hiperalgesia mecânica, edema de joelho e migração de leucócitos) induzida por zymosan. No modelo de peritonite, o ácido betulínico (composto presente em 0,23% do EEDd) e EEDd inibiram significativamente a infiltração leucocitária induzida por zymosan, no entanto não houve efeitos significativos na concentração de nitrito. Além disso, o tratamento *in vitro* não induziu citotoxicidade de leucócitos. No teste de toxicidade aguda com EEDd, foi observada uma DL50 acima de 2000 mg/kg. O tratamento oral durante 28 dias com EEDd não provocou alterações nos principais órgãos, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos e também não induziu depressão ou ansiedade. Os ensaios genéticos em camundongos tratados com EADd não revelaram diferenças significativas no dano celular e este não alterou a atividade fagocítica ou a contagem de leucócitos periféricos. Analisando os resultados podemos concluir que o pode atuar como um agente antinociceptivo que não apresenta genotoxicidade e que EEDd exibiu potencial antiartrítico, sem sinais de toxicidade e sintomas de depressão ou ansiedade. Compostos identificados na espécie como ácido betulínico, trigonelina e isoquercetina podem estar relacionados com as atividades evidenciadas por nossos achados. Este estudo contribui para justificar, em parte, o uso popular de *D. dentatus* no manejo da dor.

**Palavras-chave:** Dor. Inflamação articular. Toxicidade. Genotoxicidade. Ácido betulínico.

**Antinociceptive and antiarthritic analysis and toxicity potential of the aqueous and ethanolic extract from leaves of *Dolioscarpus dentatus* (Aubl.) Standl. *in vivo***

**ABSTRACT**

Several experimental models have been developed to study the inflammatory process and the associated pain, hence, these models are important for the discovery of new drugs. Medicinal plants are useful sources for developing new pharmacological therapies since conventional medicines could cause many side effects. *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae) is used in folk medicine to relieve pain related to the inflammatory process and the literature reports few evidences of analgesic and anti-inflammatory effects. Thus, the objective of the study was to assess the antinociceptive and antiarthritic and determine the toxic potential of the aqueous (EADd) and ethanolic (EEDd) extracts from leaves of *D. dentatus* in *in vivo* experimental models. Compounds were identified in EADd by UHPLC-HRMS (Ultra high-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry). Male and female *Swiss* mice and C57BL/6 male mice were used for the tests. The oral dose of 17 mg/kg EADd, calculated according to ethnopharmacological uses and doses of 30, 100 and 300 mg/kg were used to test in formalin and acetic acid-induced models of pain and behavior. EADd (100, 1000 e 2000 mg/kg) was assayed in mice by comet, micronucleus and phagocytosis tests. Doses of 30, 100 and 300 mg/kg of EEDd was tested in formalin and acetic acid-induced models of pain. EEDd (100 and 300 mg/kg) was also tested in the assays of chronic inflammation with complete Freund's adjuvant (CFA) and joint inflammation induced by zymosan. Betulinic acid of 0.3, 3 e 30 mg/kg and EEDd 100 e 300 mg/kg were used in the zimosan-induced peritonitis model. In the cell viability test (MTT), EEDd was tested at 3, 10, 30 and 90 µg/mL. In the acute toxicity test, 500, 1000 and 2000 mg/kg EEDd were administered in a single dose. Doses of 75, 150 and 300 mg/kg EEDd were administered for subacute toxicity for 28 days and behavioral parameters were analyzed. Oral treatments with EADd and EEDd significantly inhibited nociceptive sensitivity in neurogenic and inflammatory phase and decreased formalin-induced cold hypersensitivity and also prevented nociceptive behavior in the model of acetic acid-induced abdominal contortions. In the CFA model, the treatment for 21 days with EEDd significantly inhibited mechanical hyperalgesia, edema and cold response. In the same way, EEDd prevented joint inflammation (mechanical hyperalgesia, knee edema and leukocyte migration) induced by zymosan. In the peritonitis

model, betulinic acid (compound present in 0.23% of the EEDd) and EEDd significantly inhibited zymosan-induced leukocyte infiltration, however, did not produce significant effects on the concentration of nitrite. In addition, *in vitro* treatment did not induce leukocyte cytotoxicity. In the acute toxicity test with EEDd, LD50 above 2000 mg/kg was observed. Oral treatment for 28 days with EEDd did not change in the main organs, hematological and biochemical parameters and also did not induce depression or anxiety. Genetic assays in mice treated with EADd revealed no significant differences in genotoxic cell damage and did not alter phagocytic activity or peripheral leukocyte count, indicating that EADd has no genotoxic potential. Analyzing the results, we can conclude that could act as an antinociceptive agent that does not present genotoxicity and that EEDd exhibited antiarthritic potential, with no signs of toxicity and symptoms of depression or anxiety in mice. The compounds identified at the species such as betulinic acid, trigonelline and isoquercetin may be related to the activities observed in the extracts. This study contributes to justify, in part, the popular use of *D. dentatus* in pain management, ensuring its safe use.

**Keywords:** Pain. Joint inflammation. Toxicity. Genotoxicity. Betulinic acid.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Processo inflamatório	18
2.2 Dor inflamatória	20
2.3 Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos	22
2.4 Modelos experimentais de inflamação e de dor inflamatória	24
2.4.1 Dor induzida por formalina	24
2.4.2 Contorção abdominal induzida por ácido acético	25
2.4.3 Inflamação crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF)	25
2.4.4 Inflamação articular e peritonite induzida por zymosan	26
2.4.5 Testes <i>in vitro</i>	27
2.4.5.1 Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)	27
2.4.5.2 Análise de viabilidade celular (MTT)	28
2.5 Avaliação da toxicidade	28
2.5.1 Genotoxicidade	29
2.5.2 Avaliação da toxicidade aguda	30
2.5.3 Avaliação da toxicidade subaguda	30
2.5.4 Ensaio cometa	31
2.5.5 Ensaio do micronúcleo	32
2.5.6 Ensaio de fagocitose esplênica	32
2.6 Plantas medicinais	33
2.7 <i>Doliocarpus dentatus</i>	34
2.7.1 Ácido betulínico	36
3 OBJETIVOS	38
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5 APÊNDICES	56
5.1 Artigo 1	57
5.2 Artigo 2	88
5.3 Artigo 3	104
6 CONCLUSÕES	124
7 ANEXOS	125
7.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA)	126





## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta fisiológica envolvida na patogenia de várias doenças. A resposta inflamatória visa restaurar e proteger o tecido afetado contra danos, que podem ser provocados por alguma lesão ou infecção (SAKAI; SHICHITA, 2018). Esta reação pode ser coordenada por diversos mecanismos, que se manifestados de forma exacerbada pode desencadear diversas patologias, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso, câncer e diabetes (PIETERSE; VAN DER VLAG, 2014; HEADLAND; NORLING, 2015; GUPTA et al., 2018).

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, durante o processo inflamatório, a ativação de nociceptores periféricos são mediados por circuitos neurais que levam à percepção de dor como um sinal de dano tecidual e lesão nervosa. A resposta inflamatória induzida pelo dano ao tecido periférico desencadeia a liberação de uma série de mediadores inflamatórios que se ligam a receptores expressos em neurônios nociceptivos, colaborando para a o estímulo e manutenção da dor (BASBAUM et al., 2009; YUAN et al., 2019). A dor pode afetar significativamente as atividades da vida diária do indivíduo, levando à ansiedade e depressão, trazendo impactos físicos e psicossociais (MICHAELIDES; ZIS, 2019).

Para que o processo inflamatório e doloroso seja controlado é necessário o uso de medicamentos que regulem ou suprimam a inflamação. No entanto, sempre há preocupações relacionadas ao uso seguro desses medicamentos, visto que essas as classes utilizadas no manejo da dor inflamatória são conhecidas por apresentar efeitos colaterais clinicamente relevantes, sendo de fundamental importância a busca por novas alternativas terapêuticas (GHASEMIAN et al., 2016; RONCHETTI et al., 2017).

Nesse sentido, produtos naturais de origem vegetal são considerados uma importante fonte para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias, devido variedade de compostos com propriedades biológicas promissoras (YANG et al., 2017). Estudos têm sido realizados com plantas medicinais para desenvolver novos medicamentos anti-inflamatórios a partir de extratos ou compostos isolados devido a necessidade de novos agentes terapêuticos seguros e com menores menos efeitos colaterais (LOURENÇO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018).

*Doliocarpus dentatus* (família Dilleniaceae), conhecida no Brasil como cipó-vermelho, é uma planta com aspecto de lianas grandes, podendo ser encontrada no cerrado e na região amazônica (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Popularmente, essa espécie é

usada para aliviar a sede e suas folhas são utilizadas para o alívio da dor relacionada ao processo inflamatório (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; RODRIGUES, 2007; JAGESSAR; PERSID, 2014). O extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* apresentou ação anti-inflamatória e antimicobacterianas, sem sinais de genotoxicidade (ISHIKAWA et al., 2017; ISHIKAWA et al., 2018). Estudos fitoquímicos com *D. dentatus* revelaram a presença do composto ácido betulínico (JAGESSAR et al., 2013), que exibe uma gama de propriedades biológicas, entre elas, atividade anti-inflamatória (EKUADZI et al., 2018; HUIMIN et al., 2019).

Além da comprovação terapêutica de um produto obtido a partir de plantas, outro aspecto a ser considerado é seu perfil toxicológico. Dentre os testes utilizados para avaliar toxicidade de produtos naturais, podemos destacar os testes de genotoxicidade. Esses ensaios são usados como modelos para avaliar danos ao DNA ou cromossômicos, onde a detecção de uma alteração, mesmo que precoce, pode indicar o desenvolvimento de neoplasias ou de outras doenças (ANVISA, 2013; CARDOSO et al., 2016; SHIN et al., 2020).

Diante do exposto, vale ressaltar que existe um incentivo e investimento por parte das políticas nacionais em pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos fármacos com enfoque em espécies nativas do bioma cerrado. No entanto, poucos estudos científicos foram encontrados na literatura a fim de assegurar a indicação popular de *D. dentatus* no tratamento da dor inflamatória, bem como seus efeitos tóxicos em modelos animais. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos anti-inflamatório, antinoceptivo, antiartrítico e determinar o potencial toxicológico do extrato aquoso e etanólico das folhas de *D. dentatus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Processo Inflamatório

A inflamação é um mecanismo fisiológico benéfico que visa garantir a integridade do tecido diante de uma lesão causada por proliferação microbiana, reações imunológicas ou fatores físicos, químicos irritantes e corrosivos. Essa resposta leva à destruição ou neutralização do estímulo agressor, restabelecendo a homeostase com ações de reparo ou regeneração (AHMED, 2011; CHANDRASEKHARAN; SHARMA-WALIA, 2015; AGHASAFARI et al., 2019).

No final do século XX houve um avanço no entendimento a respeito dos mecanismos celulares, moleculares e fisiológicos envolvidos na inflamação. Foi demonstrado que a inflamação não compreende apenas os sinais clínicos (dor, edema, calor, rubor e perda da função), mas uma extensa rede de sinais celulares integrados entre o sistema imune e o tecido lesionado (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; LON et al., 2012; DEMIR et al., 2013).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa, promovendo uma cascata de eventos celulares e bioquímicos que iniciam através do reconhecimento do agente lesivo por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que sinalizam possíveis infecções, danos provocados por patógenos ou necrose ao organismo, sendo os receptores do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like receptors*) os principais receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (HAN et al., 2005; MARCOVECCHIO et al., 2012; AGHASAFARI et al., 2019).

A ativação de células do tecido lesado e liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, histamina, leucotrienos, radicais livres e eicosanoides) pelas células do sistema imune em conjunto com o recrutamento de leucócitos e células endoteliais que expressam moléculas de adesão, produzem a exsudação de proteínas e influxo de leucócitos para os tecidos, provocando alterações na superfície do endotélio, o que caracteriza a resposta vascular aguda do processo inflamatório (FULLERTON; GILROY, 2016; METZEMAEKERS et al., 2020).

No processo de formação e liberação de mediadores inflamatórios (Figura 1), o ácido araquidônico (AA) é liberado a partir da ativação da enzima fosfolipase A2. O AA pode ser metabolizado pela cicloxigenase (COX), produzindo os prostanoides: prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TxA<sub>2</sub>) e pela lipoxigenase (LOX) produzindo leucotrienos e lipoxinas. A enzima induzível cicloxigenase-2 (COX-2) é identificada como a mais frequente durante o

processo inflamatório dentre as três isoformas conhecidas da COX (BURIAN; GEISLINGER, 1995; GOETZL et al., 1995; BARTON, 2008; METZEMAEKERS et al., 2020).

A óxido nítrico sintase (NOS) é outra enzima relacionada a condições inflamatórias, sintetiza óxido nítrico (NO) que aumenta a permeabilidade vascular, inibe a adesão leucocitária e agregação plaquetária e também exerce ação citotóxica. Assim como a COX-2, possui uma isoforma aumentada nas células inflamatórias, a NOS induzível (iNOS) (SAUTEBIN, 2000; CHEN, 2005; GOMES et al., 2020).

As citocinas liberadas durante as reações imunes e inflamatórias provocam ativação, divisão, quimiotaxia e apoptose celular, estando envolvidas na diferenciação celular e reparo tecidual (HANADA; YOSHIMURA, 2002). Podem ser classificados de acordo com a sua atividade biológica em: pró-inflamatórias (interleucina (IL): IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13) (SOMMER; WHITE, 2010), as quais podemos destacar o fator de necrose tumoral (TNF) e a IL-1 $\beta$ , que irão favorecer a expressão de moléculas de adesão endoteliais e celulares (selectinas e integrinas) e portanto, a inflamação (MEAGER, 1999). Na cascata inflamatória, o NF- $\kappa$ B ativado resulta na indução de múltiplos genes que atuam na sobrevivência e preservação da integridade da função celular (NIEDERBERGER; GEISLINGER, 2008; LI et al., 2020).

Mediadores endógenos pró-resolutivos e anti-inflamatórios como resolvinas, protectinas e lipoxinas, maresinas e anexinas são produzidos para mediar os eventos inflamatórios (SERHAN; SAVILL, 2005; SERHAN et al., 2011). Além disso, os neutrófilos sofrem degranulação liberando substâncias citotóxicas como espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), seguida pela fagocitose de macrófagos residentes e apoptose, eliminando o agente agressor. Tais eventos restauram a homeostase e promovem regeneração tecidual pela ação de fibroblastos e fatores de crescimento (ASHLEY et al., 2012; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013; XUE et al., 2020).

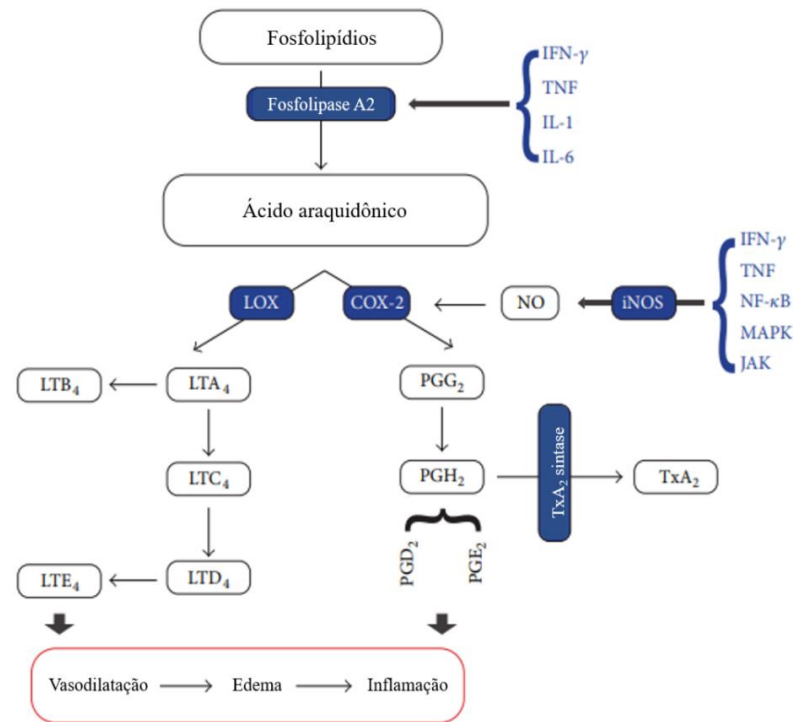


Figura 1: Cascata do ácido araquidônico e outras vias que compreendem a resposta inflamatória. Fonte: Adaptado de GHASEMIAN et al. (2016).

Quando o organismo não consegue eliminar o agente agressor, inicia-se a fase proliferativa (crônica) da inflamação, que envolve um longo processo onde ocorre degeneração e fibrose tecidual, com a presença de exsudato rico em linfócitos e macrófagos (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; FRANCO et al., 2010). Dessa forma, o processo inflamatório crônico pode ser um elemento fisiopatológico que favorece o desenvolvimento de doenças degenerativas, câncer, entre outras (KNIGHT et al., 2012; PIETERSE; VAN DER VLAG, 2014; HEADLAND; NORLING, 2015; HONG et al., 2020).

## 2.2 Dor inflamatória

A sensação ou percepção de dor tem início na periferia, através de terminações nervosas livres, os nociceptores, compostos de fibras aferentes primárias localizadas na tecido cutâneo e subcutâneo, articulações e músculos, responsáveis por detectar estímulos (térmicos, químicos ou mecânicos) transformando-os em impulsos elétricos e transmitindo esses impulsos à substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal (KLAUMANN et al., 2008; JOHNSON, 2016; FRIAS; MERIGHI, 2016; INOUE; TSUDA, 2018).

As fibras mielínicas do tipo A $\delta$  (A delta) e amielínicas do tipo C são responsáveis por essa condução e transmitem diferentes informações. As fibras A $\delta$ , de médio diâmetro, conduzem rapidamente o impulso nervoso e são responsáveis pelo primeiro estágio da dor, oriundas de sensações nocivas térmicas e mecânicas. Já as fibras C, de pequeno diâmetro, são responsáveis pelo segundo estágio da dor, aquele de caráter prolongado e sensação penetrante, e são ativadas por estímulos nocivos térmicos, químicos ou mecânicos, por isso são consideradas nociceptores polimodais (KUNER, 2010; FRIAS; MERIGHI, 2016; GOMES et al., 2020).

Na dor nociceptiva, ocorre ativação direta de nociceptores em resposta a uma lesão ou inflamação. Nesse momento, diversos mediadores locais como bradicinina, histamina, serotonina (5-HT), NO, adenosina trifosfato (ATP), fator de crescimento neural (NGF), peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), substância P, dentre outros ativam os nociceptores gerando uma sensibilização periférica local (D'MELLO; DICKENSON, 2008; OBARA et al., 2020).

Durante o processo inflamatório, a resposta nociceptiva pode ser acompanhada de duas alterações sensoriais: hiperalgesia (sensibilidade aumentada para um estímulo doloroso) ou alodinia (estímulos inócuos normais). Quando o estímulo nocivo é persistente, o sistema nervoso central (SNC) é sensibilizado pelo aumento da condução sináptica nos neurônios da raiz dorsal pelas fibras C. Nesta sensibilização central, o desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia inicia-se com ativação dos receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) pelo glutamato (VOGT; SIKES, 2000; TREEDE, 2016; MA et al., 2020).

O aumento da permeabilidade vascular do tecido lesado é promovido pela ação das monoaminas (histamina e 5-HT), enquanto a bradicinina ativa as fibras A $\delta$  e C. As células lesadas provocam o aumento da expressão de COX-2, levando ao aumento da síntese e liberação de PGs, como a PGE<sub>2</sub>, que atua em conjunto com as monoaminas nos receptores metabotrópicos das fibras C, ativando segundos mensageiros como AMPc (adenosina monofosfato cíclico), PKA (proteína quinase A) e PKC (proteína quinase C) (VERRI JUNIOR et al., 2006; KLAUMANN et al., 2008; KUNER, 2010).

Substâncias produzidas por células do sistema imune, como PGs e histamina desempenham um papel direto na regulação da dor, favorecendo a sensibilização dos nociceptores e a hiperalgesia. O TNF é uma citocina pró-inflamatória responsável por ativar IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 sendo um iniciador da dor neuropática. A IL-1 $\beta$  aumenta a expressão de COX-2 e conseqüentemente a síntese de PGs, NGF e CGRP, a IL-6 também aumenta a síntese de prostanoídes e a IL-8 induz a liberação de aminas simpatomiméticas hiperalgésicas,

assim todos em conjunto promovem a hipernocicepção. A neutralização dos receptores dessas citocinas na superfície dos nociceptores pode resultar na redução rápida da dor antes da resposta inflamatória (CLARK, et al., 2013; JI et al., 2016; PINHO-RIBEIRO et al., 2017; COOK et al., 2018).

A condução do sinal de dor também pode ser inibida pelo trato neural descendente, que representa o sistema antinociceptivo e compreende os peptídeos opioides serotonina, dopamina e norepinefrina. Nos estágios iniciais da inflamação a expressão de opioides endógenos liberados pelas células imunes é aumentada no corno dorsal da medula espinhal e ativam os receptores opioides nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais. Essa interação entre as células do sistema imunológico e os neurônios sensoriais periféricos, que promove redução na liberação sináptica de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), resultando no alívio da dor (TREEDE, 2016; RONCHETTI et al., 2017).

A dor, quando não controlada, pode ter efeitos prejudiciais, afetando significativamente a qualidade de vida do indivíduo e desencadando problemas relacionados à ansiedade, depressão e transtornos de humor, trazendo impactos físicos e psicossociais, especialmente àqueles com dor crônica (MICHAELIDES; ZIS, 2019).

### **2.3 Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos**

De maneira geral, os esteroides (glicocorticoides ou GCs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados no tratamento da inflamação e dor associados a uma série de doenças e outras condições traumáticas. No entanto, efeitos adversos clinicamente relevantes têm sido relacionados ao uso desses medicamentos (RONCHETTI et al., 2017; SALOMÉ et al., 2020).

Os GCs pertencem a família dos hormônios esteroides e exercem papel importante em uma gama de processos fisiológicos, como a regulação de vias homeostáticas e de desenvolvimento, além de diversas funções imunológicas (BECKER, 2013; MANNA et al., 2016). O uso de GCs é uma das abordagens no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias como artrite reumatoide, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, psoríase, entre outras (HARDY et al., 2020; SLOMINSKI et al., 2020).

Essas drogas produzem seus efeitos regulando direta ou indiretamente a expressão da transcrição gênica de vários agentes. Os principais efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios dos GCs incluem a transcrição de DNA e posteriormente a síntese de proteínas que interferem na ativação de fatores de transcrição, inibindo a expressão de mediadores pró



inflamatórios: IL-1, IL-2, IL-6, TNF e INF- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), COX-2, iNOS e NF-kB e ativando genes anti-inflamatórios (IL-10 e lipocortina) (STREHL et al., 2011; TORRES et al., 2012). Quando administrado por longos períodos, os GCs apresentam efeitos adversos bem estabelecidos, tais como osteoporose e fratura, diabetes, obesidade, hipertensão, síndrome de Cushing, entre outros (HIRATA et al., 2012; VAN RAALTE et al., 2013; RAFF; CARROLL, 2015; LILLEGRAVEN et al., 2019; CHOTIYARNWONG; MCCLOSKEY, 2020).

Os AINEs constituem uma das classes de fármacos mais empregadas no tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas, especialmente a dor associada à inflamação (BADRI et al., 2016). Em geral, o mecanismo de ação dos AINEs é relacionado à redução da biossíntese de PGs, inibindo as duas isoformas da enzima COX, promovendo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. O grupo mais tradicional de AINEs são os não seletivos, que bloqueiam tanto a isoforma COX-1 como a COX-2, já os mais recentes bloqueiam seletivamente a COX-2 (VANE, 1971; DAY; GRAHAM, 2013).

Os efeitos adversos provocados pelo uso prolongado dos AINEs não seletivos estão relacionados a toxicidade gastrointestinal (resultando em lesão gástrica e ulcerações) e renal (MACDONALD et al., 1997; KIM et al., 2019). No entanto, apesar da utilização de inibidores seletivos de COX-2 reduzir os efeitos adversos em relação aos AINEs não seletivos, estes podem levar um aumento do risco doenças cardiovasculares e trombose (ABRAHAM et al., 2007; AL-AZAYZIH et al., 2020).

Outra classe de medicamentos utilizados para o tratamento da dor aguda, pós-operatória e crônica são os opioides. Essa classe é representada pela morfina e seus derivados, e sua ação analgésica é exercida através da sua interação com receptores opioides (Mu, Delta e Kappa) presentes no SNC, bem como em todos os tecidos periféricos. Esses receptores são produzidos por peptídeos endógenos nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais em resposta à estimulação nociva (TRESCOT et al., 2008).

Como após uma lesão tecidual a dor é desencadeada pela liberação de mediadores inflamatórios, embora os opioides sejam úteis no manejo da dor, estes não conseguem bloquear o componente inflamatório. Nesse contexto, os AINEs são os medicamentos disponíveis mais eficazes para o tratamento da dor e da inflamação. Dessa forma, espera-se em um futuro próximo novos tratamentos farmacológicos eficazes que interferem no processo de sensibilização à dor e no controle da inflamação sem produzir efeitos adversos significativos (RONCHETTI et al., 2017).

## 2.4 Modelos experimentais de inflamação e de dor inflamatória

### 2.4.1 Dor induzida por formalina

O teste da formalina é um modelo de nocicepção, que produz uma resposta bifásica de mecanismos nociceptivos, composta de uma fase inicial aguda, com ativação dos nociceptores primários, e por um período mais prolongado, produzindo uma resposta inflamatória e sensibilização central no corno dorsal da medula espinhal. O período entre as duas fases é chamado de intervalo de quiescência (ABBOTT et al., 1981; HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; MARTINS et al., 2006). Este teste envolve a injeção subcutânea de formalina (0,5–5%) na superfície plantar do animal, que permite a quantificação da resposta em comportamentos específicos como levantar, lambe e estremecer a pata, além de vocalização (DUBUISSON; DENNIS, 1977; MCNAMARA et al., 2007).

Imediatamente após a injeção de formalina inicia-se a primeira fase, a qual se estende pelos primeiros 5 minutos, onde ocorre estimulação direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e A $\delta$ , e está relacionada à liberação de NO, substância P e aminoácidos excitatórios. Entre 15 e 30 minutos ocorre a segunda fase, com liberação de mediadores pró-inflamatórios, como PGs, bradicinina e 5-HT. No intervalo de quiescência há bloqueio da transmissão nociceptiva pelos circuitos supra-espinhais e espinhais (HUNSKAAR; HOLE, 1987; CLAVELOU et al., 1995; BARROT, 2012). Drogas de ação central, como opioides, inibem ambas as fases, enquanto drogas de ação periférica, como AINEs, que bloqueiam a produção de PGs, inibem apenas a segunda fase (SHIBATA et al., 1989; DAMAS; LIEGEOIS, 1999).

### 2.4.2 Contorção abdominal induzida por ácido acético

O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético é um modelo de nocicepção que se baseia na contagem das contorções dos músculos abdominais seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores como resposta reflexa à irritação peritoneal, e é utilizado para investigar drogas que reduzem a dor periférica, como AINEs e opioides (WHITTLE, 1964; BARROT, 2012; DE SOUZA et al., 2012).

A aplicação de ácido acético na cavidade peritoneal do animal promove sensibilização periférica através da liberação de mediadores endógenos nociceptivos (DUARTE et al., 1988; OH et al., 2015). Além disso, ocorre liberação de diversos mediadores presentes no processo

inflamatório, como histamina, bradicinina, eicosanoides e leucotrienos (VERMA et al., 2005; BAHAMONDE et al., 2013). O ácido acético atua nos macrófagos e basófilos da cavidade abdominal induzindo a liberação de citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF, aumentando a liberação de glutamato e aspartato no fluido cérebro-espinhal (FENG et al., 2003), havendo também um aumento nos níveis de PGs e de permeabilidade vascular (RADU; CHERNOFF, 2013; VERRI JUNIOR et al., 2006).

#### 2.4.3 Inflamação crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF)

O modelo de inflamação persistente induzida pelo adjuvante completo de Freund (ACF - suspensão de óleo com *Mycobacterium tuberculosis* morto) é utilizado para estudar a dor inflamatória crônica em roedores, visto que a injeção intraplantar de ACF resulta em hiperalgesia mecânica e térmica e edema bem localizado (WATANABE et al., 2000; LONGO et al., 2013). A espécie de camundongos C57BL/6 é usada frequentemente em modelos de artrite, pois apresenta início sincronizado, pouca variação e 100% de incidência no desenvolvimento de artrite (BÄCKLUND et al., 2013; ATKINSON; NANSEN, 2017).

A resposta imunológica acontece imediatamente após a injeção de ACF, levando ao inchaço do tecido (Figura 2), dessa forma o teste pode seguir dois regimes de tratamento: regime profilático (0-8 dias) e terapêutico (após o 8º dia) (BENDELE, 2001). O modelo de poliartrite inflamatória induzida por ACF é caracterizado por promover características clínicas e patológicas similares a da artrite reumatoide, com infiltração da membrana sinovial e destruição da articulação (PEARSON 1956; ZHENG et al., 2014).

O processo inflamatório induz a produção de COX-2 com posterior liberação de NO, prostanoïdes e bradicinina, além da indução da fosforilação dos canais iônicos nos nociceptores, levando a sensibilização dos neurônios. Esse mecanismo está envolvido na dor inflamatória e relacionado com a dor crônica (CHU et al., 2005; BOTTING, 2006; BASBAUM et al., 2009). Além disso, a injeção intraplantar de ACF estimula a produção de vários mediadores inflamatórios, como PGE2, TNF, IL-1 e IL-6, fator de crescimento, desenvolvendo reação inflamatória de longa duração, contribuindo para indução de dor nas articulações (KIDD; URBAN, 2001; INGLIS et al., 2005; SOMMER; WHITE, 2010). Vários medicamentos utilizados na clínica, como GCs, AINEs, metotrexato e agentes biológicos mostraram efetividade no modelo de artrite induzida por ACF (BENDELE et al., 1999).



Figura 2: Pata direita com artrite 21 dias após a indução por ACF: animal controle (A) e animal tratado com dexametasona (B). Fonte: SANTOS (2017).

#### 2.4.4 Inflamação articular e peritonite induzida por zymosan

O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (VOLUISKAIA et al., 1959), induz inflamação quando injetado nas articulações, cavidade peritoneal ou pele e promove ativação da via alternativa do sistema complemento levando à liberação de mediadores inflamatórios (IMAI et al., 1991; KOLACZKOWSKA et al., 2001).

A administração intra-articular de zymosan é um modelo animal para o estudo de novas estratégias terapêuticas para artrite reumatoide (GEGOUT et al., 1994; GUERRERO et al., 2012). A hiperalgesia induzida por zymosan é desencadeada pela interação com receptores TLR, promovendo a ativação do NF- $\kappa$ B, induzindo a liberação de citocinas relacionadas à resposta inflamatória aguda, incluindo IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF, quimiocinas e NO (AJUEBOR et al., 1998; CHOW et al., 1999; FRASNELLI et al., 2005; GUERRERO et al., 2012). Além disso, na inflamação induzida por zymosan também estão envolvidos produtos do AA, endotelina-1 e infiltração de neutrófilos (CONTE et al., 2008; LEITE et al., 2015; HASHIMOTO et al., 2018).

Na cavidade peritoneal do animal, a aplicação de zymosan promove extravasamento de plasma e proteínas plasmáticas para a região peritoneal, induzido por aminas vasoativas e eicosanoides, levando a formação do edema. Os eventos iniciais da inflamação são coordenados por NO e prostanoídes, provocando a vasodilatação. O início do recrutamento de leucócitos é mediado por citocinas pró-inflamatórias que ativam a via de sinalização em células endoteliais, as quais regulam a expressão de moléculas de adesão (LEITE et al., 2007). Fármacos como os GCs e AINEs podem diminuir a migração celular no modelo de peritonite induzida por zymosan (GRIFFITHS et al., 1991; RAO et al., 1994).

## 2.4.5 Testes *in vitro*

### 2.4.5.1 Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)

O NO é um radical livre de meia-vida curta, sintetizado a partir da L-arginina pela enzima NOS em diversos tipos celulares. As isoformas constitutivas de NOS estão presentes em condições fisiológicas no organismo, caracterizadas em neurônios e em células endoteliais. Já a forma induzível (iNOS) é expressa pelas células inflamatórias em respostas a diversos estímulos (COLEMAN, 2001; KRAUSZ; FRIEDMAN, 2015).

No interior das células, o NO é um gás solúvel produzido por diversos tipos celulares que se difunde livremente entre as membranas celulares, utilizado como um agente tóxico ou de sinalização entre células e tecidos (MONCADA et al., 1991; BUTLER et al., 1995; COLEMAN, 2001). Apresenta funções biológicas, como um potente vasodilatador, com características pró-inflamatórias, como aumento da permeabilidade e produção de PGs e inibidor da agregação plaquetária, representando um papel importante na resposta inflamatória e imune (GUZIK et al., 2003; HODGKINSON et al., 2015).

O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica, levando a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. Durante o processo infeccioso, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam NO e espécies reativas do oxigênio (EROs), e sua ação citotóxica resulta da reação com esses intermediários do oxigênio (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). A produção de NO por macrófagos ativados promove uma resposta inflamatória, levando ao aumento na síntese citocinas e derivados do AA devido sua capacidade de ativar a enzima COX-2 (DUDHGAONKAR et al., 2004). Nesse sentido, o NO pode contribuir para algumas condições patológicas, como a artrite reumatoide, lesões ateroscleróticas, entre outras (ERSOY et al., 2002; VERMA et al., 2003; ALI et al., 2014).

Na determinação endógena, o NO propriamente dito não é evidenciado devido sua evanescência, dessa forma, é realizada a quantificação de nitrito, produto da depuração do NO (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Dados da literatura demonstram que a peritonite induzida por zymosan leva a produção de NO pelo aumento da expressão da iNOS (CUZZOCREA et al., 1997; TSUDA et al., 2002).

#### 2.4.5.2 Análise de viabilidade celular (ensaio MTT)

O ensaio do MTT foi descrito primeiramente em 1983 por Mosmann para avaliar compostos com atividade antitumoral e ao longo do tempo diversos autores aperfeiçoaram e aplicaram o método em diversos estudos de citotoxicidade devido a rapidez e fácil reprodutibilidade que o teste oferece. Essa técnica tem sido utilizada em uma variedade de linhagens celulares que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial para a avaliação do crescimento e sobrevivência celular (CARMICHAEL et al., 1987; CHAPDELAINÉ, 2010).

No teste do MTT, o sal de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5- difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que apresenta coloração amarelo-pálido em solução e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto através das enzimas desidrogenases mitocondriais. Ao sofrer redução, o MTT é convertido em um substrato cromogênico (formazan) de coloração azul-escuro, insolúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. A capacidade das células em reduzirem o MTT indica a integridade e atividade mitocondrial, que são interpretados indicadores da viabilidade celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

### 2.5 Avaliação da toxicidade

Além da comprovação terapêutica de um produto obtido a partir de plantas, outro aspecto a ser considerado é seu perfil toxicológico. Pesquisas toxicológicas agregam valor à etnofarmacologia, além de fornecerem informações sobre possíveis riscos relevantes à saúde e evitar a ocorrência efeitos indesejáveis, que são considerados o problema em relação as drogas sintéticas (MIRZA; PANCHAL, 2019).

A fim de garantir a segurança dos fitoterápicos, a execução dos estudos toxicológicos deve seguir um roteiro proposto pela ANVISA, baseado nas diretrizes internacionais da OECD (do inglês *Organisation for Economic Cooperation and Development*) e outras agências regulatórias que normatizam parâmetros mínimos para a realização dos testes de toxicidade pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2013; OECD, 2008a; OECD, 2008b).

De acordo com o órgão de regulamentação sanitária americano, FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) (2010), a avaliação da segurança de uma substância tem como objetivo caracterizar os efeitos tóxicos relacionados ao órgão alvo, avaliar a dose dependência, tempo de exposição e a possibilidade de reverter os efeitos, bem como

determinar o tempo em que os sinais de toxicidade aparecem. Na prática, os ensaios de avaliação das propriedades tóxicas incluem toxicidade aguda, subaguda, subcrônica, crônica, carcinogênica e efeitos reprodutivos, os quais envolvem uso de animais de laboratório sob condições adequadas e a escolha da espécie, dose e via de administração são determinantes para o sucesso do teste (SAGANUWAN, 2017; YATES et al., 2017).

### 2.5.1 Genotoxicidade

A genotoxicidade constitui a área da toxicologia que estuda processos que alteram o DNA, denominado mutagênese. Os agentes genotóxicos são aqueles que apresentam a capacidade de interagir com o DNA, alterando sua estrutura ou função, o que compromete sua replicação e transmissão genética. Normalmente a lesão é reparada fisiologicamente, e quando essas alterações são persistentes, pode ocorrer mutações (alterações hereditárias), que são herdadas pelas células filhas durante a replicação (EASTMOND et al., 2009).

Os danos genotóxicos acometem todos os seres vivos, seja por razões naturais, fatores endógenos ou fatores externos ao organismo, sendo responsáveis pela variedade genética da população. Quando benéficas, as alterações no DNA podem melhorar condições de sobrevivência e reprodução em um determinado ambiente, garantindo adaptação e a evolução da espécie. No entanto, quando apresentam resultados maléficos podem aumentar a incidência de doenças hereditárias, câncer e teratogenicidade (OLIVEIRA et al., 2013).

O potencial genotóxico de um determinado composto é verificado através de testes bem definidos por agências regulatórias nacionais e internacionais como parte da bateria de testes preconizados para a síntese de novos fármacos (HAYASHI et al., 2000). Estes ensaios devem ser realizados nas fases iniciais com a finalidade de reconhecer uma possível atividade genotóxica (FREITAS et al., 2010).

A utilização simultânea de mais de um ensaio de genotoxicidade *in vivo* permite a cobertura adequada dos diferentes desfechos que precisam ser avaliados durante a verificação do potencial genotóxico de uma substância química. Dessa forma, a utilização conjunta dos ensaios cometa e do micronúcleo fornece dados complementares na monitorização de danos em populações expostas a agentes genotóxicos (ROTHFUSS et al., 2011). Outra vantagem da combinação destes ensaios é redução do número de animais utilizados nos protocolos experimentais.

### 2.5.2 Avaliação da toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda é utilizado para determinar o potencial de toxicidade de uma substância administrada em dose única ou mais doses durante um período não superior a 24 horas com posterior observação diária dos animais por 14 dias após a administração. O ensaio de toxicidade aguda é considerado a etapa inicial para a avaliação do perfil toxicológico de uma substância após a administração de doses excessivas, demonstrando os efeitos produzidos, além de sugerir o mecanismo de toxicidade envolvido. O princípio do teste é evitar o uso de doses que sejam capazes de matar, empregando apenas doses moderadamente tóxicas (OECD, 2008a; ANVISA, 2013).

O protocolo recomendado pela OECD estabelece uma dose inicial e é observado o padrão de sobrevivência do animal em 48 horas, a dose do próximo animal é escolhida baseada na sobrevivência ou morte do primeiro. Este método é indicado pelas agências por utilizar um número reduzido de animais, além de permitir estimar a DL50 (dose letal mediana) com um intervalo de confiança (OECD, 2008a).

Os sinais de toxicidade observados durante o teste são relacionados a presença ou ausência dos parâmetros da triagem hipocrática: estado de consciência (atividade geral, locomoção); atividade e coordenação de sistema motor e tonificação muscular (resposta ao toque e pegada da cauda, força para agarrar, endireitar e tonificar o corpo); reflexos; atividades no sistema nervoso central (tremores, convulsões, sedação, anestesia e ataxia) e atividades no sistema nervoso autônomo (lacrimejamento, cianose, ptose, salivação e piloereção) (MALONE; ROBICHAUD, 1962; OECD, 2008a).

### 2.5.3 Avaliação da toxicidade subaguda

Os estudos de toxicidade subaguda são realizados a partir da disponibilidade dos dados iniciais sobre os estudos de toxicidade aguda. Este teste permite investigar os efeitos que podem surgir da exposição de doses repetidas durante um período limitado de tempo (28 dias) e fornece informações para o estabelecimento de doses para os estudos subcrônicos de longo prazo. A via de administração da droga deve ser a mesma em que se pretende administrar em humanos e a espécie de escolha mais indicada são os roedores (OECD, 2008b; ANVISA, 2013).

Durante o teste de toxicidade subaguda os animais são avaliados diariamente quanto a alterações no ganho de massa corpórea, consumo de água e ração, sinais clínicos (incluindo alterações comportamentais), função motora, morbidade e mortalidade. Ao final do experimento, é feita a coleta de amostra de sangue dos animais anestesiados para a realização



de exames hematológicos e bioquímicos e os principais órgãos são retirados para avaliação do peso, análise macroscópica e histopatológica (OECD, 2008b).

#### 2.5.4 Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma técnica adaptada por Singh e colaboradores (1988), amplamente utilizada no meio científico por ser relativamente de baixo custo, com alta sensibilidade e reprodutibilidade, a qual vem sendo reproduzida com algumas modificações descritas por pesquisadores ao longo do tempo, transformando-a numa ferramenta de grande importância na avaliação de danos genômicos.

Trata-se de uma técnica sensível que utiliza eletroforese em gel de agarose capaz de detectar e classificar pequenos fragmentos no DNA e permite avaliar danos que podem ser reparados. Nas células com DNA danificado observa-se a migração dos fragmentos de DNA livres que consistem em uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado), que se assemelha à forma de um cometa. Tais danos podem ser visualizados em microscópio de fluorescência (TICE et al., 2000; KANG et al., 2013; TRAESEL et al., 2017).

Os cometas podem ser classificados comparando o tamanho da cauda com o tamanho do nucleóide da célula em: classe 0 (células não danificadas que não apresentam cauda); classe 1 (célula com cauda menor que o diâmetro do nucleóide); classe 2 (célula com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide) e classe 3 (célula com cauda 2 ou mais vezes o tamanho do diâmetro do nucleóide) (Figura 3) (SPEIT et al., 1996; AFANASIEVA et al., 2010).

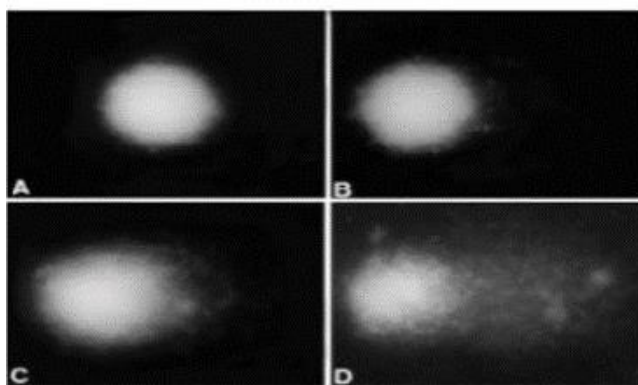


Figura 3: Classificação dos cometas de acordo com níveis de danos no DNA. Classe 0 (A), classe 1 (B); classe 2 (C) e classe 3 (D). Fonte: FREITAS (2007).

#### 2.5.5 Ensaio do micronúcleo

O ensaio do micronúcleo é um teste biológico para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (TWEATS et al., 2007). Os micronúcleos são fragmentos de DNA que resultam de quebras ou cromossomos inteiros perdidos durante a ação de divisão celular que não são capazes de se incorporar ao núcleo principal das células filhas e que, portanto, não são passíveis de reparo (VALENTE et al., 2017). São estruturas especificamente redondas e possuem textura e cor semelhante ao núcleo principal (MÜLLER; STREFFER, 1994). A estabilidade e persistência da lesão ao DNA é uma vantagem desse teste em relação ao ensaio cometa, que mensura apenas danos iniciais que podem ser reparados (BONASSI et al., 2016).

O teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de roedores como um método de detectar danos cromossômicos e cromatídicos que permanecem no citoplasma dos eritrócitos imaturos após a última divisão celular. Posteriormente, essa técnica também foi padronizada no sangue periférico com resultados equivalentes àqueles obtidos da medula óssea, com a vantagem da realização de várias coletas, permitindo analisar a quantidade de dano cromossomal em diferentes tempos de exposição (SCHMID, 1975; HAYASHI et al., 1990; SILVA; NEPOMUCENO, 2010; QUEIROZ et al., 2013).

O índice de micronúcleos tem se tornado um dos parâmetros mais bem estabelecidos para avaliação citogenética de lesões que ocorrem no DNA (NERSESYAN; ADAMYAN, 2004). A verificação do dano mutagênico através do ensaio do micronúcleo em um sistema *in vivo* leva em conta elementos do metabolismo experimental, processos farmacocinéticos e mecanismos de reparo do DNA, o que torna este ensaio de grande valia para a investigação do potencial genotóxico (KRISHNA; HAYASHI, 2000; MORITA et al., 2016).

#### 2.5.6 Ensaio de fagocitose esplênica

O baço é um órgão que pode ser definido como o de maior acúmulo de tecido linfático do organismo (BANKS, 1992). Por sua localização anatômica que permite um intenso fluxo sanguíneo, o baço responde rapidamente aos antígenos que invadem a corrente sanguínea, sendo um filtro fagocitário e imunológico importante (BOHNSACK; BROWN, 1986; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O baço produz linfócitos e monócitos, fagocita partículas estranhas, células lesionadas, xenobióticos, além de produzir opsoninas, responsáveis por estimular a fagocitose e iniciar a via alternativa do sistema complemento. Além disso, é fonte de células hematopoiéticas,

sobretudo em caso de anemias severas e pode sequestrar leucócitos e plaquetas ocasionando leucopenia e plaquetopenia (MELBIUS; KRAAL, 2005; DI SABATINO et al., 2011). Em virtude de sua riqueza em células fagocitárias e da extrema proximidade entre o sangue e essas células, o baço desempenha uma importante função de defesa contra microorganismos que penetram no sangue circulante (CESTA, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Neste ensaio, um fragmento do baço é analisado em microscópio de epifluorescência a fim de observar células com algum indício de fagocitose (OLIVEIRA et al., 2015). Como o baço está diretamente envolvido nos processos de imunomodulação e a fagocitose esplênica é efetiva no sequestro de células anucleadas e/ou micronucleadas, mascarando possíveis lesões celulares, tal ensaio favorece a precisão das análises de frequência de danos no DNA (ensaio cometa e do micronúcleo, por exemplo) (CARVALHO et al., 2015).

## **2.6 Plantas medicinais**

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos representa uma área importante das pesquisas científicas em decorrência da diversidade química e biológica e da grande quantidade de compostos naturais conhecidos por suas ações em alvos moleculares e celulares (YANG et al., 2017). Dentre as vantagens do uso de plantas medicinais estão a acessibilidade, baixo custo e, normalmente, menor incidência de reações adversas. Estudos e pesquisas são realizados para confirmar e elucidar a ação das plantas medicinais a fim de reduzir efeitos indesejáveis e toxicológicos, garantindo o uso seguro e eficaz (FIRMO et al., 2011; BHATTACHARYA, 2017).

Devido a sua grande biodiversidade, o Brasil é uma importante fonte de plantas medicinais, com mais de 45,000 espécies, compreendendo de 20 a 22% do total de espécies de plantas do mundo (RIBEIRO et al., 2018). Ainda, o Brasil possui abundância de abrigos e ecossistemas da região amazônica, sendo a maior floresta tropical do mundo, além da vegetação do cerrado, designada a savana com a maior biodiversidade do mundo (MATHEUS et al., 2017; NEWMAN, 2017).

Considerando essa grande variedade das espécies vegetais brasileiras, várias plantas ainda não foram pesquisadas quanto às atividades biológicas, o que abre a oportunidade de realizar estudos para a descoberta de novos compostos, fornecer informações sobre o potencial farmacológico dessas espécies e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BOLZANI et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018).

O governo brasileiro tem empregado esforços para garantir a utilização correta de plantas medicinais e produtos naturais na atenção primária à saúde, visto que algumas comunidades carentes têm pouco ou nenhum acesso aos medicamentos, principalmente acesso diminuído à medicina convencional (CARVALHO et al., 2011; MAZZARI; PRIETO, 2014). Nesse contexto, em 2006 foi implementado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) a fim de promover o acesso gratuito e seguro às plantas medicinais (BRASIL, 2006). O Sistema Único de Saúde (SUS) preconizou o uso plantas medicinais aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) baseado em dados etnofarmacológicos e criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008).

No ano de 2009, o Ministério da Saúde (MS) divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), buscando terapias alternativas para tratar doenças que afetam a comunidade. A lista contém 71 espécies de plantas nativas de diversos biomas que podem levar ao desenvolvimento de novos produtos, a fim de contribuir com a assistência farmacêutica nos serviços públicos de saúde brasileiros (BRASIL, 2009). Essa lista é de grande valia para a medicina popular, pois está contribuindo com os avanços em pesquisas para determinar segurança e eficácia de plantas medicinais, bem como incentivar a população a realizarem o uso de fitoterápicos (MARMITT et al., 2015).

Apesar da variedade de espécies vegetais brasileiras com diversas propriedades biológicas já descritas, ainda há um longo caminho a ser percorrido no que tange a validação e descoberta das propriedades farmacológicas de produtos naturais em benefício da sociedade. Pesquisas devem ser realizadas com o intuito de descobrir e desenvolver novos medicamentos seguros e eficazes, contando com estudos pré-clínicos e clínicos de extratos padronizados e compostos isolados. Vale destacar que as plantas medicinais brasileiras constituem uma fonte promissora para estas pesquisas (RIBEIRO et al., 2018).

## ***2.7 Doliocarpus dentatus***

O gênero *Doliocarpus* pertence a família Dilleniaceae, podendo ser destacado como um dos gêneros mais diversificados dessa família, apresentando 34 espécies (FRAGA; STEHMANN, 2010), entre elas a *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. (Figura 4). Essa espécie é conhecida no Brasil como cipó-vermelho e pode ser encontrado na Mata Atlântica, floresta amazônica e no bioma Cerrado do Brasil (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; APONTE et al., 2007).

A seiva aquosa de *D. dentatus* é usada para aliviar a sede, e suas folhas são utilizadas pela população para aliviar a dor e inchaço associados ao processo inflamatório (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; RODRIGUES, 2007; JAGESSAR; PERSID, 2014). Esta planta também é usada no tratamento de hemorroidas (BIESKI et al., 2015), infecções do trato urinário (RIBEIRO et al., 2017) e malária (RAMÍREZ et al., 2017).

Estudos científicos com os extratos hexânico, diclorometano, acetato de etila, etanólico e etanólico hidrolisado dos caules, galhos, raízes e cascas de *D. dentatus* revelaram a presença de esteroides, cumarinas, flavonas, taninos, lactonas, antracenosídeos, trigonelina e ácido butírico (JAGESSAR et al., 2013), enquanto fenois, flavonoides, ácido betulínico, betulina, sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, quercetina e kaempferol foram revelados no extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* (ISHIKAWA et al., 2017; ISHIKAWA et al., 2018).

Estudos *in vitro* mostram que *D. dentatus* apresenta atividade contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (SAUVAIN et al., 1996), além de atividades contra outros microrganismos, como *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumonia*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (JAGESSAR; PERSID, 2014). Além disso, esta espécie demonstrou propriedades citotóxicas em células leucêmicas da linhagem K562 (APONTE et al., 2008).

Ishikawa e colaboradores (2017) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* apresenta ação anti-inflamatória nos modelos de pleurisia e de edema de pata induzidos por carragenina, e atividades antimicobacterianas, sem apresentar sinais de genotoxicidade nos testes de cometa, micronúcleo e fagocitose. Esses mesmos autores também sugeriram que o mesmo extrato nas doses de 100 e 1000 mg/kg não afeta o desenvolvimento embrionário e não é teratogênico em camundongos fêmeas prenhas (ISHIKAWA et al., 2018).

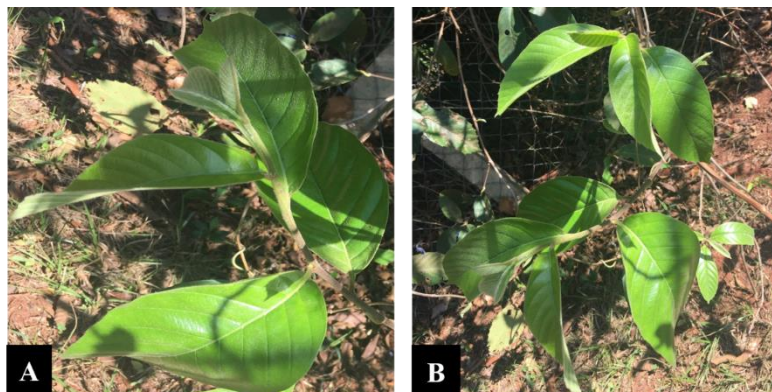


Figura 4 (A e B): Folhas de *D. dentatus*. Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.8.1 Ácido betulínico

Entre os compostos presentes no extrato etanólico de *D. dentatus*, o ácido betulínico (AB) é encontrado em proporção de cerca de 0,23% (ISHIKAWA et al., 2017). O AB é um triterpeno pentacíclico, vastamente distribuído no reino vegetal, podendo ser encontrado em plantas, frutos e vegetais, ainda que em pequenas quantidades (MOGHADDAM et al., 2012).

Pesquisas científicas demonstraram propriedades biológicas do BA, tais como efeitos analgésico e antipirético (OYEBANJI et al., 2014), antibacteriano (OLOYEDE et al., 2017), citotóxico (GUPTA et al., 2017), anti-HIV (HUANG et al., 2018), atividades anticâncer (NEDOPEKINA et al., 2017), antileishmanicida (SOUSA et al., 2014), antidepressiva (MACHADO et al., 2013) e prevenção e tratamento da hiperglicemia (KIM et al., 2014).

Além disso, estudos mostram que o AB apresenta atividade anti-inflamatória (HUIMIN et al., 2019; EKUADZI et al., 2018). Alguns trabalhos demonstraram redução da expressão de fatores de adesão celular, fatores nucleares, inibição de vias metabólicas do AA, redução na produção de citocinas e regulação imunológica, podendo tais efeitos estar envolvidos nos mecanismos anti-inflamatórios do BA (SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2011; JINGBO et al., 2015; WANG; ZHAO, 2019). Mais especificamente, estudos relatam que o BA inibe a expressão do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e regula a sinalização da COX-2 após diversos estímulos em várias linhagens celulares. Além da via de sinalização NF- $\kappa$ B, a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) também reduz a produção de PGE2 (JINGBO et al., 2015; WANG et al., 2016; OU et al., 2019).

Diante disso, nota-se que as informações científicas sobre as atividades biológicas de *Doliocarpus dentatus* são limitadas e, faltando estudos sobre o perfil de segurança do extrato

vegetal. Considerando o uso popular de *D. dentatus*, o presente estudo analisou o potencial farmacológico e toxicológico do extrato aquoso e etanólico da planta, a fim de criar novas perspectivas para o tratamento de doenças inflamatórias e da dor inflamatória que apresentem menos efeitos colaterais.

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL

Determinar o potencial anti-inflamatório, antinociceptivo, antiartrítico e tóxico do extrato aquoso e etanólico obtido das folhas de *Doliocarpus dentatus* *in vivo* e *in vitro*.

#### ESPECÍFICOS

- Analisar os componentes fitoquímicos do extrato aquoso das folhas de *D. dentatus*.
- Avaliar o potencial anti-nociceptivo do extrato aquoso e etanólico das folhas de e *D. dentatus* em modelos de injeção intraplantar de formalina e de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético.
- Determinar a atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* em modelo de inflamação crônica induzido pelo ACF.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antiartrítica do extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* nos modelos de inflamação articular e peritonite induzidos por zymosan.
- Avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* através dos testes de toxicidade aguda e subaguda.
- Avaliar a atividade genotóxica do extrato aquoso das folhas de *D. dentatus* através dos ensaios cometa micronúcleo e fagocitose esplênica.
- Analisar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* no ensaio de viabilidade celular (MTT).
- Avaliar a capacidade do uso prolongado (toxicidade subaguda) do extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* provocar depressão e ansiedade.



#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; LUDWICK, R. J.; MELZACK, R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 637-640, 1981.

ABRAHAM, N. S.; EL-SERAG, H. B.; HARTMAN, C.; RICHARDSON, P.; DESWAL, A. Cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of myocardial infarction and cerebrovascular accident. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 913-24, Apr 2007. ISSN 0269-2813.

AFANASIEVA, K.; ZAZHYTSKA, M.; SIVOLOB, A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. **Electrophoresis**, v. 31, n. 3, p. 512-519, 2010.

AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation research**, v. 68, n. 1, p. 59-74, 2019.

AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 4, p. 274-281, 2011. ISSN 1674-7984.

AJUEBOR, M. N.; VIRAG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, v. 95, n. 4, p. 625, 1998.

AL-AZAYZIH, A. AL-AZZAM, S. I.; ALZOUBI, K. H.; JARAB, A. S.; KHARABA, Z.; AL-RIFAI, R. H.; ALNAJJAR, M. S. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Utilization Patterns and Risk of Adverse Events due to Drug-Drug Interactions among Elderly Patients: A Study from Jordan. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2020.

ALI, A. M.; HABEEB, R. A.; EL-AZIZI, N. O.; KHATTAB, D. A.; ABO-SHADY, R. A.; ELKABARITY, R. H. Níveis de óxido nítrico mais elevados estão associados à atividade da doença em pacientes egípcios com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 6, p. 446-451, 2014.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. **Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF**. Brasil.

APONTE, J. C.; VAISBERG, A. J.; ROJAS, R.; CAVIEDES, L.; LEWIS, W. H.; LAMAS, G.; SARASARA, C.; GILMAN, R. H.; HAMMOND, G. B. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 102-105, 2008.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

ATKINSON, S. M.; NANSEN, A. Pharmacological value of murine delayed-type hypersensitivity arthritis: A robust mouse model of rheumatoid arthritis in C57 BL/6 mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 108-114, 2017.

BÄCKLUND, J.; LI, C.; JANSSON, E.; CARLSEN, S.; MERKY, P.; NANDAKUMAR, K. S.; HAAG, S.; YTTERBERG, J.; HOLMDAHL, R. C57BL/6 mice need MHC class II Aq to develop collagen-induced arthritis dependent on autoreactive T cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 7, p. 1225-1232, 2013.

BADRI, W.; MILADI, K.; NAZARI, Q. A.; GREIGE-GERGES, H.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1-2, p. 757-773, Dec 2016. ISSN 1873-3476.

BAHAMONDE, S. M. A.; FLORES, M.; L.; CÓRDOBA, O. L.; TAIRA, C. A.; GORZALCZANY, S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliotrichum diffusum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 699-705, 2013.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413, 2008.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009. ISSN 0092-8674.

BECKER, D. E. Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. **Anesthesia Progress**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2013.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. C1424-C1437, 1996.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, n. 4, p. 377-85, 2001.

BENDELE, A. MCCOMB, J.; GOULD, T. Y.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 134-142, 1999.

BHATTACHARYA, S. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 349-354, 2017.

BIESKI, I. G. C.; LEONTI, M.; ARNASON, J. T.; FERRIER, J.; RAPINSKI, M.; VIOLANTE, I. M. P.; BALOGUN, S. O.; PEREIRA, F. C. A.; FIGUEIREDO, R. C. F.; LOPES, C. R. A. S.; SILVA, D. R.; PACINI, A.; ALBUQUERQUE, U. P.; DA SILVA, D. R. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of valley of Juruena region, legal amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 2015.

BOHNSACK, J. F.; BROWN, E. J. The role of the spleen in resistance to infection. **Annual Review of Medicine**, v. 37, p. 49-59, 1986.

BOLZANI, V. DA S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

BONASSI, S.; MILIĆ, M.; NERI, M. Frequency of micronuclei and other biomarkers of DNA damage in populations exposed to dusts, asbestos and other fibers. A systematic review. **Mutation Research**, v. 770, n. Pt A, p. 106-118, 2016. ISSN 1873-135X.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, n. 1, p. 208-219, 2006. ISSN 0306-4565.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos*. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Gabinete do Ministro. Portaria Interministerial nº 2.960 de 9 de dezembro de 2008, aprova o *Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos*. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS*. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos*. Brasília, 2009.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 2, p. 139-154, 2005.

BUTLER, A. R.; FLITNEY, F. W.; WILLIAMS, D. L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, 16: 18-22, 1995.

CARDOSO, V. D. S.; VERMELHO, A. B.; RIBEIRO, C. A. DE L.; DE OLIVEIRA, J. M.; DE LIMA, M. E. F.; DA SILVA, L. H. P.; DIREITO, G. M.; MIRANDA DANELLI, M. D. G. Antigenotoxic effect of piperine in broiler chickens intoxicated with Aflatoxin B1. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 316, 2016.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936- 942, 1987.

CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; COSTA E SILVA, L. V.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. D. O.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 467-473, 2011.

CARVALHO, P. C.; SANTOS, E. A.; SCHNEIDER, B. U. C.; MATUO, R.; PESARINI, J. R.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; LIMA, D P.; ANTONIOLLI, A. C. M. B.; OLIVEIRA, R. J. 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, 2015.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137-158, 1998.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 455–465, 2006.

CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 181, 2015.

CHAPDELAINÉ, J. M. MTT reduction-a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. **Pharmaceutical Research**, p. 1-6, 2001.

CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 3, p. 259-264, 2005. ISSN 1745-7254.

CHOTIYARNWONG, P.; MCCLOSKEY, E. V. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, p. 1-11, 2020.

CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10689-10692, 1999.

CHU, Y. C.; GUAN, Y.; SKINNER, J.; RAJA, S. N.; JOHNS, R. A.; TAO, Y. X. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 113-123, 2005. ISSN 0304-3959.

CLARK, A. K.; OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **Journal of Pain Research**, v. 6, p. 803, 2013.

CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUET, T.; WODA, A.; RABOISSON, P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, n. 3, p. 295-301, 1995.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, 1:1397-1406, 2001.

CONTE, F. P.; BARJA-FIDALGO, C.; VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, F. Q.; RAE, G; A.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. D. G. M. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , and CXCL-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 3, p. 652-660, 2008.

COOK, A. D.; CHRISTENSEN, A. D.; TEWARI, D.; MCMAHON, S. B.; HAMILTON, J. A. Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain. **Trends in immunology**, v. 39, n. 3, p. 240-255, 2018.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; SAUTEBIN, L.; RIZZO, A.; CRISAFULLI, C.; CAMPO, G. M.; COSTANTINO, G.; CALAPAI, G.; NAVA F.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.

P. Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. **Shock**, v. 8, n. 4, p. 268–275, 1997.

DAY, R. O.; GRAHAM, G. G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **BMJ**, v. 346, p. f3195, 2013. ISSN 1756-1833.

DE SOUZA, G. F. P.; ZARPELON, A. C.; TEDESCHI, G. C.; MIZOKAMI, S. S.; SANSON, J. S.; CUNHA, T. M.; FERREIRA S. H.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI JUNIOR, W. A. Acetic acid-and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI3K and microglia in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 320-328, 2012.

DEMIR, I. E.; SCHÄFER, K. H.; TIEFTRUNK, E.; FRIESS, H.; CEYHAN, G. O. Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity. **Acta Neuropathologica**, v. 125, n. 4, p. 491-509, 2013.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DI SABATINO, A.; CARSETTI, R.; CORAZZA, G. R. Post-splenectomy and hyposplenic states. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 86-97, 2011.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 2, p. 341-343, 1988.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

DUDHGAONKAR, S. P.; KUMAR, D.; NAIK, A.; DEVI, A. R.; BAWANKULE, D. U.; TANDAN, S. K. Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2-3, p.117-122, 2004.

EASTMOND, D. A.; HARTWIG, A.; ANDERSON, D.; ANWAR, W. A.; CIMINO, M. C.; DOBREV, I.; GEORGE, R. D.; TAKEHIKO, N.; DAVID, H. P.; VICKERS, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 341-349, 2009.

EKUADZI, E.; BINEY, R. P.; BENNEH, C. K.; AMANKWAA, B. O.; JATO, J. Antiinflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan-induced pleurisy model of lung inflammation in mice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 480-487, 2018.

ERSOY, Y.; ÖZEROL, E.; BAYSAL, Ö.; TEMEL, I.; MACWALTER, R. S.; MERAL, Ü.; ALTAY, Z. E. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis,

ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, n. 1, p. 76-78, 2002.

FDA. Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2010.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. D. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v. 98, n. 3, p. 729-733, 2003.

FIRMO, W. C. A.; DE MENEZES, V. D. J. M.; DE CASTRO PASSOS, C. E.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, vol. 18, no. especial, pp. 90-95, 2011.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: O Simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, p.265-271, 2000.

FRAGA, C. N. DE; STEHMANN, J. R. Novidades taxonômicas para Dilleniaceae brasileiras. **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. S01-S06, 2010.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; DE BRITO, T.; BACCHI, C. E.; DE ALMEIDA, C. P. Patologia: processos gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 106-106, 2010. ISSN 0036-4665.

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBANZ-PÉCLAT, V.; BUSSO, N.; SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2005.

FREITAS, P. S. Investigação do Potencial Mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo*. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano - Alfenas, Minas Gerais, 2007.

FREITAS, T. M.; CELSO, F. B.; DA SILVA, T. G.; PEREIRA, P.; PICADA, J. N. Avaliação do efeito genotóxico do aripiprazol em camundongos. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 8, 2010.

FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, nociception and pain. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 797, 2016.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2016. ISSN 1474-1776.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sciences**, v. 55, n. 17, p. PL321-PL326, 1994.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of anti-inflammatory herbal medicines. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, 2016.

GOETZL, E. J.; AN, S.; SMITH, W. L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases 1. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 11, p. 1051-1058, 1995.

GOMES, I. F.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. **Biochemical Pharmacology**, p. 113862, 2020.

GRIFFITHS, R. J.; LI, S. W.; WOOD, B. E.; BLACKHAM, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 32, n. 3-4, p. 312-320, 1991.

GUERRERO, A. T. G.; CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51-57, 2012.

GUPTA, N.; RATH, S. K.; SINGH, J.; QAYUM, A.; SINGH, S.; SANGWAN, P. L. Synthesis of novel benzylidene analogues of betulinic acid as potent cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 135, p. 517-530, 2017.

GUPTA, S. C.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, S.; AGGARWAL, B. B. Inflammation, a double-edge sword for cancer and other age-related diseases. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2160, 2018.

GUZIK, T.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HAN, J.i; ULEVITCH, R. J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1198-1205, 2005.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4, p. 413-421, 2002. ISSN 1359-6101.

HARDY, R. S.; RAZA, K.; COOPER, M. S. Therapeutic glucocorticoids: mechanisms of actions in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, p. 1-12, 2020.

HASHIMOTO, K.; ODA, Y.; NAKAGAWA, K.; IKEDA, T.; OHTANI, K.; AKAGI, M. LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. **European Journal of Histochemistry**, v. 62, n. 1, 2018.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I. D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 234 - 252, 2000.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. In: Seminars in immunology. **Academic Press**, p. 149-160, 2015. ISSN 1096-3618.

HIRATA, A.; MAEDA, N.; NAKATSUJI, H.; HIUGE-SHIMIZU, A.; OKADA, T.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 419, n. 2, p. 182-7, Mar 2012. ISSN 1090-2104.

HODGKINSON, J. W.; GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Biology of bony fish macrophages. **Biology (Basel)**, v. 4, n. 4, p. 881-906, 2015.

HONG, J-I; PARK, I. Y.; KIM, H. A. Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Arthritis Pain Using Animal Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 533, 2020.

HUANG, Q.; CHEN, H. F.; LUO, X. R.; ZHANG, Y. X.; YAO, X.; ZHENG, X. Structure and anti-HIV activity of betulinic acid analogues. **Current Medical Science**, v. 38, n. 3, p. 387-397, 2018.

HUIMIN, D.; HUI, C.; GUOWEI, S.; SHOUYUN, X.; JUNYANG, P.; JUNCHENG, W. Protective effect of betulinic acid on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 33, n. 9, p. e22373, 2019.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IMAI, Y.; HAYASHI, M.; OH-ISHI, S. Key role of complement activation and platelet-activating factor in exudate formation in zymosan-induced rat pleurisy. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 225-232, 1991.

INGLIS, J. J.; NISSIM, A.; LEES, D. M.; HUNT, S. P.; CHERNAJOVSKY, Y.; KIDD, B. L. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 4, p. R807, 2005. ISSN 1478-6354.

INOUE, Kazuhide; TSUDA, Makoto. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138, 2018.

ISHIKAWA, R. B.; LEITÃO, M. M.; KASSUYA, R. M.; MACORINI, L. F.; MOREIRA, F. M. F.; CARDOSO, C. A. L.; COELHO, R. G.; POTT, A.; GELFUSO, G. M.; CRODA, J.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A. L. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus dentatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 18-25, 2017.

ISHIKAWA, R. B.; VANI, J. M.; DAS NEVES, S. C.; RABACOW, A. P. M.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J.; CARDOSO, C. A. L.; MONREAL, A. C. D. F.; ANTONIOLLI, A. C. M. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; OLIVEIRA, R. J. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 1-6, 2018.



JAGESSAR, R. C.; HOOLAS, G., MAXWELL, A. R. Phytochemical screening, isolation of betulinic acid, trigonelline and evaluation of heavy metals ion content of *Doliocarpus dentatus*. **Journal of Natural Products**, v. 6, 2013.

JAGESSAR, R. C.; PERSID, R. Antimicrobial activity of uncombined and combined extracts of *Doliocarpus dentatus* and *Montricardia arborescens*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 1, p. 286, 2014.

JHA, M. K.; JEON, S.; SUK, Ky. Glia as a link between neuroinflammation and neuropathic pain. **Immune network**, v. 12, n. 2, p. 41-47, 2012.

JI, RU-RONG; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y-Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.

JINGBO, W.; AIMIN, C.; QI, W.; XIN, L.; HUAINING, L. Betulinic acid inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammation by activating PPAR- $\gamma$  in human osteoarthritis chondrocytes. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 687-692, 2015.

JOHNSON, C. Research tools for the measurement of pain and nociception. **Animals**, v. 6, n. 11, p. 71, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Textos e Atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12<sup>o</sup> ed, 2013.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J. K.; SEO, Y. R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 4, p. 277-88, 2013. ISSN 2288-3649.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIM, S. J.; QUAN, H. Y.; JEONG, K. J.; KIM, D. Y.; KIM, G. W.; JO, H. K.; CHUNG, S. H. Beneficial effect of betulinic acid on hyperglycemia via suppression of hepatic glucose production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 434-442, 2014.

KIM, T. J.; KIM, E. R.; HONG, S. N.; KIM, Y. H.; LEE, Y. C.; KIM, H. S.; KIM, K.; CHANG, D. K. Effectiveness of acid suppressants and other mucoprotective agents in reducing the risk of occult gastrointestinal bleeding in nonsteroidal anti-inflammatory drug users. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, 2008.

KNIGHT, J. S.; CARMONA-RIVERA, C.; KAPLAN, M. J. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 380, 2012. ISSN 1664-3224.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 1, p. 33-42, 2001.

KRAUSZ, A.; FRIEDMAN, A. J. Nitric oxide as a surgical adjuvant. **Future Science OA**, v. 1, n. 1, p. FSO56, 2015.

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

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LEITE, D. F. P.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C.; CALIXTO, J. B.; RUMJANEK, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 630-637, 2007.

LEITE, J. A.; ALVES, A. K. D. A.; GALVÃO, J. G. M.; TEIXEIRA, M. P.; SILVA, C. L. H. A.; SCAVONE, C.; MORROT, A.; RUMJANEK, V. M.; MASCARENHAS, R. S. Ouabain modulates zymosan-induced peritonitis in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

LI, L.; YU, R.; CAI, T.; CHEN, Z.; LAN, M.; ZOU, T.; CAI, Y. Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106939, 2020.

LILLEGRAVEN, S.; GREENBERG, J. D.; REED, G. W.; SAUNDERS, K.; CURTIS, J. R.; HARROLD, L.; HOCHBERG, M. C.; PAPPAS, D. A.; KREMER, J. M.; SOLOMON, D. H. Immunosuppressive treatment and the risk of diabetes in rheumatoid arthritis. **Plos One**, v. 14, n. 1, p. e0210459, 2019.

LON, H. K.; LIU, D.; JUSKO, W. J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 4, p. 295-312, 2012

LONGO, G.; OSIKOWICZ, M.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. Sympathetic fiber sprouting in inflamed joints and adjacent skin contributes to pain-related behavior in arthritis. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 24, p. 10066-10074, 2013.

LOURENÇO, A. M.; M FERREIRA, L.; S BRANCO, P. Molecules of natural origin, semi-synthesis and synthesis with anti-inflammatory and anticancer utilities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3979-4046, 2012.

MA, M.; WANG, Z.; WANG, J.; WEI, S.; CUI, J.; WANG, Y.; WANG, R. Endomorphin analog exhibited superiority in alleviating neuropathic hyperalgesia via weak activation of NMDA receptors. **Journal of Neurochemistry**, 2020.

MACDONALD, T. M.; MORANT, S. V.; ROBINSON, G. C.; SHIELD, M. J.; MCGILCHRIST, M. M.; MURRAY, F. E.; MCDEVITT, D. G. Association of upper gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with continued exposure: cohort study. **British Medical Journal**, v. 315, n. 7119, p. 1333-1337, 1997.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A.; BETTIO, L. E.; OLIVEIRA, A.; PAZINI, F. L.; DALMARCO, J. B.; SIMIONATTO, E. L.;

- PIZZOLATTI, M. G. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 999-1005, 2013.
- MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*. v. 25, p. 320-331, 1962.
- MANNA, P. R.; STETSON, C. L.; SLOMINSKI, A. T.; PRUITT, K. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. **Endocrine**, v. 51, n. 1, p. 7-21, 2016.
- MARCOVECCHIO, M. L.; MOHN, A.; CHIARELLI, F. Inflammatory cytokines and growth in childhood. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 19, n. 1, p. 57-62, 2012.
- MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. D. C. Plantas medicinais da RENISUS com potencial anti-inflamatório: revisão sistemática em três bases de dados científicas. **Revista Fitos**. v. 9, p. 73–159, 2015.
- MARTINS, M. A.; BASTOS, L. DE C.; TONUSSI, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 2, p. 100-107, 2006.
- MATHEUS, M. T.; RODRIGUES-JUNIOR, A. G.; OLIVEIRA, D. M.; GARCIA, Q. S. Seed longevity and physical dormancy break of two endemic species of *Dimorphandra* from Brazilian biodiversity hotspots. **Seed Science Research**, v. 27, n. 3, p. 199-205, 2017.
- MAZZARI, A. L. D. A.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 162, 2014.
- MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MAGDALENE M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.
- MEAGER, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 10, n. 1, p. 27-39, 1999. ISSN 1359-6101.
- MELBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 606-616, 2005.
- METZEMAEKERS, M.; GOUWY, M.; PROOST, P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. **Cellular & Molecular Immunology**, p. 1-18, 2020.
- MICHAELIDES, A; ZIS, P. Depression, anxiety and acute pain: links and management challenges. **Postgraduate Medicine**, v. 131, n. 7, p. 438-444, 2019.
- MIRZA, A. C.; PANCHAL, S. S. Safety evaluation of syringic acid: subacute oral toxicity studies in Wistar rats. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02129, 2019.

- MOGHADDAM, M. G; AHMAD J. B. H.; SAMZADEH-KERMANI A. Biological activity of betulinic acid: a review. **Pharmacology & Pharmacy**, 3: 119–123, 2012.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43:109-142, 1991.
- MORITA, T.; HAMADA, S.; MASUMURA, K.; WAKATA, A.; MANIWA, J.; TAKASAWA, H.; YASUNAGA, K.; HASHIZUME, T.; HONMA, M. Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 802, p. 1-29, 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MÜLLER, W. U., STREFFER, C. Micronucleus assays. In: **Advances in Mutagenesis Research**, v. 5, p. 134, 1994.
- NEDOPEKINA, D. A.; GUBAIDULLIN, R. R.; ODINOKOV, V. N.; MAXIMCHIK, P. V.; ZHIVOTOVSKY, B.; BEL'SKII, Y. P.; KHAZANOV, P. A.; MANUYLOVA, A. V.; GOGVADZE, V.; SPIVAK, A. Y. Mitochondria-targeted betulinic and ursolic acid derivatives: synthesis and anticancer activity. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 8, n. 10, p. 1934-1945, 2017.
- NERSESYAN, A. K.; ADAMYAN, R. T. Micronuclei level in exfoliated buccal mucosa cells of patients with benign and malignant tumors of female reproductive organs and breast. **Tsitol Genet Journal**, v. 38, p. 72-75, 2004.
- NEWMAN, D. J. The influence of Brazilian biodiversity on searching for human use pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 402-414, 2017.
- NIEDERBERGER, E.; GEISSLINGER, G. The IKK-NF- $\kappa$ B pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? **The FASEB Journal**, v. 22, n. 10, p. 3432-3442, 2008. ISSN 0892-6638.
- OBARA, I.; TELEZHKIN, V.; ALRASHDI, I.; CHAZOT, P. L. Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief. **British journal of pharmacology**, v. 177, n. 3, p. 580-599, 2020.
- OECDa, Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Publishing, 2008.
- OECDb, Test No. 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Publishing, 2008.
- OH, Y. C.; JEONG, Y. H.; CHO, W. K.; HA, J. H.; GU, M. J.; MA, J. Y. Anti-inflammatory and analgesic effects of pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xylene-induced ear edema. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1232-1251, 2015.

OLIVEIRA, R. J.; NAVARRO, S. D.; DE LIMA, D. P.; MEZA, A.; PESARINI, J. R.; DA SILVA R. G.; KARAZIACK, C. B.; MAURO, M. DE O.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; ROMÃO, W.; LACERDA JÚNIOR, V. A novel cytosporone 3-Heptyl-4, 6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 561, 2015.

OLIVEIRA, R. J.; SALLES, M. J. S.; SILVA, A. F. D.; KANNO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. D. S.; LEITE, V. D. S.; MATIAZI, H. V.; PESARINI, J. R.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. *In vivo* evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 3, p. 413-424, 2013.

OLOYEDE, H. O. B.; AJIBOYE, H. O.; SALAWU, M. O.; AJIBOYE, T. O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 338-344, 2017.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013.

OU, Z.; J., ZHU, L.; HUANG, L.; MA, Y.; MA, C.; ZHU, L. Z.; YUAN, Z.; WU, J; LI, R.; YI, J. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109347, 2019.

OYEBANJI, B. O.; SABA, A. B.; ORIDUPA, O. A. Studies on the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of betulinic acid derived from *Tetracera potatoria*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 1, p. 30-33, 2014.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n. 1, p. 95-101, 1956.

PIETERSE, E.; VAN DER VLAG, J. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 164, 2014. ISSN 1664-3224.

PINHO-RIBEIRO, FELIPE A.; VERRI JR, WALDICEU A.; CHIU, ISAAC M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends in immunology**, v. 38, n. 1, p. 5-19, 2017.

QUEIROZ, F. M.; MATIAS, K. W. O.; CUNHA, M. M. F.; SCHWARZ, A. Evaluation of (anti)genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, 2013.

RADU, M.; CHERNOFF, J. An *in vivo* assay to test blood vessel permeability. **Journal of Visualized Experiments**, n. 73, p. e50062, 2013.

RAFF, H.; CARROLL, T. Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 3, p. 493-506, 2015.

RAMÍREZ, O.; BLAIR, S. Ethnobotany of Medicinal Plants Used to Treat Malaria by Traditional Healers from Ten Indigenous Colombian Communities Located in Vaupes Medio. **Biodiversity International Journal**, v. 1, n. 4, p. 151-167, 2017.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, n. 3, p. 917-925, 1994.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. DE O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

RODRIGUES, V. E. G. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande, MG. 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RODRIGUES, V. E. G.; DE CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1445-1452, 2017.

ROTHFUSS, A.; HONMA, M.; CZICH, A.; AARDEMA, M. J.; BURLINSON, B.; GALLOWAY, S.; HAMADA, S.; KIRKLAND, D.; HEFLICH, R. H.; HOWE, J.; NAKAJIMA, M.; O'DONOVAN, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; PRIESTLEY, C.; RECIO, L.; SCHULER, M.; UNO, Y.; MARTUS, H.-J. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.

SAGANUWAN, S. A. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: An overview. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n 4, p. 291–318, 2017.

SAKAI, S.; SHICHITA, T. Inflammation and neural repair after ischemic brain injury. **Neurochemistry international**, v. 130, p. 104316, 2018.

SALOMÉ, D. D. C.; CORDEIRO, N. D. M.; VALÉRIO, T. S.; SANTOS, D. D. A.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. *Aristolochia trilobata*: Identification of the Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, p. 111, 2020.

SANTOS, J. A. Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Extrato Etanólico das Folhas de *Salvia lachnostachys* Benth e de Fruticulina A em Modelo Experimental com Roedores. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados, Mato Grosso do Sul, 2017.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, v. 71, p. S48-S57, 2000. ISSN 0367-326X.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J. C.; GAYRAL, P.; DEDET, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 1996.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SERHAN, C. N.; KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N. Novel anti-inflammatory-pro-resolving mediators and their receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 629-647, 2011.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989. ISSN 0304-3959.

SHIN, S.; YI, J. M.; KIM, N. S.; PARK, C. S.; KIM, S. H.; BANG, O. S. Aqueous extract of *Forsythia viridissima* fruits: Acute oral toxicity and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112381, 2020.

SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**, v. 1, p. 167-179, 2010.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SLOMINSKI, R. M.; TUCKEY, R. C.; MANNA, P. R.; JETTEN, A. M.; POSTLETHWAITE, A.; RAMAN, C.; SLOMINSKI, A. T. Extra-adrenal glucocorticoid biosynthesis: implications for autoimmune and inflammatory disorders. **Genes & Immunity**, p. 1-19, 2020.

SOMMER, C.; WHITE, F. **Cytokines, chemokines, and pain**. Em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 279-302, 2010.

SOUSA, M. C.; VARANDAS, R.; SANTOS, R. C.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALVADOR, J. A. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e89939, 2014.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HEIBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 88, n. 1-3, p. 91-98, 1996.

STREHL, C.; SPIES, C. M.; BUTTGEREIT, F. Pharmacodynamics of glucocorticoids. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 29, n. 5, p. S13, 2011.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; PLEWKA, K.; DANILUK, J.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Betulin and betulinic acid attenuate ethanol-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS), cytokine (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) production and by influencing intracellular signaling. **Toxicology**, v. 280, n. 3, p. 152-163, 2011.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; ROJAS, M. E.; RYUS, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, DE F. V. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. **Corpus Et Scientia**, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012.

TRAESEL, G. K.; DE 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. Safety assessment of oil from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): evaluation of the potential genotoxic and clastogenic effects. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 8, p. 804-811, 2017.

TREEDE, R. D. Gain control mechanisms in the nociceptive system. **Pain**, v. 157, n. 6, p. 1199-1204, 2016.

TRESCOT, A. M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S133, 2008.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 48, n. 4, p. 305-10, 2002.

TWEATS, D. J.; BLAKEY, D.; HEFLICH, R. H.; JACOBS, A.; JACOBSEN, S. D.; MORITA, T.; NOHMI, T.; O'DONOVAN, M. R.; SASAKI, Y. F.; ISOFUNI, T.; TICE, R. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory *in vivo* tests: II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 92-105, 2007.

VALENTE, D.; COSTA-AMARAL, I. C.; CARVALHO, L. V. B. D.; SANTOS, M. V. C. D.; CASTRO, V. S. D.; RODRIGUES, D. D. R. F.; FALCO, A.; SILVA, C. B.; NOGUEIRA, A. M.; GONÇALVES, E. S.; MOREIRA, J. C.; ANDRÉ, L. C.; TEIXEIRA, L. R.; SARCINELLI, P. DE N.; SISENANDO, H. A.; OLIVEIRA, M. S.; PERINI, J. A.; MATTOS, R. C. O. DA C.; LARENTIS, A. L. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

VAN RAALTE, D. H.; DIAMANT, M.; OUWENS, D. M.; IJZERMAN, R. G.; LINSSEN, M. M.; GUIGAS, B.; ERINGA, E. C.; SERNÉ, E. H. Glucocorticoid treatment impairs microvascular function in healthy men in association with its adverse effects on glucose metabolism and blood pressure: a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 56, n. 11, p. 2383-91, Nov 2013. ISSN 1432-0428.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VERMA, P. R. JOHARAPURKAR, A. A.; CHATPALLIWAR, V. A.; ASNANI, A. J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 298-301, 2005.



VERMA, S.; BUCHANAN, M. R.; ANDERSON, T. J. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2054-2059, 2003.

VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VOGT, B. A.; SIKES, R. W. The medial pain system, cingulate cortex, and parallel processing of nociceptive information. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 223-236, 2000.

VOLUISKAIA, E. N.; CHEBURKINA, N. V.; TOVARNITSKII, V. I.; NIKOL'SKAIA, I. N. Isolation and chemical composition of zymosan. **Voprosy Meditsinskoi Khimii**, v. 5, n. 2, p. 143-148, 1959.

WANG J, ZHAO Q. Betulinic acid inhibits cell proliferation, migration, and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 2151-2158, 2019.

WANG, S.; YANG, Z.; XIONG, F.; CHEN, C.; CHAO, X.; HUANG, J.; HUANG, H. Betulinic acid ameliorates experimental diabetic-induced renal inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 434, p. 135-143, 2016.

WATANABE, M.; ENDO, Y.; KIMOTO, K.; KATOH-SEMBA, R.; ARAKAWA, Y. Inhibition of adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in rats by local injection of neurotrophin-3. **Neuroscience Letters**, v. 282, n. 1-2, p. 61-64, 2000.

WHITTLE, B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, n. 4, p. 369-IN1, 1964.

XUE, Y.; DAI, S.; LIANG, J.; JI, W. Effect of reactive oxygen species of the psoas major muscle in complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in rats. **Molecular pain**, v. 16, p. 1744806920929246, 2020.

YANG, R.; YUAN, B. C.; MA, Y. S.; ZHOU, S.; LIU, Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 5-18, 2017.

YATES, A. A.; ERDMAN, J. W. JR.; SHAO, A.; DOLAN, L. C.; GRIFFITHS, J. C. Bioactive nutrients - Time for tolerable upper intake levels to address safety. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 84, p. 94-101, 2017. ISSN 1096-0295.

YUAN, L.; MINGXIAO, Y.; FAN, W.; KE, C.; HAIYONG, C.; XUEYONG, S.; LIXING, L. Mechanism of electroacupuncture on inflammatory pain: neural-immune-endocrine interactions. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 39, n. 5, p. 740-749, 2019.

ZHENG, C. J.; ZHAO, X. X.; AI, H. W.; LIN, B.; HAN, T.; JIANG, Y. P.; XING, X.; QIN, L. P. Therapeutic effects of standardized *Vitex negundo* seeds extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 6, p. 838-846, 2014.

## 5 APÊNDICES

**Artigo 1: Aqueous extract from leaves of *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. relieves pain without genotoxicity activity**

Submetido à revista “Journal of Ethnopharmacology” (Qualis A2 - Medicina II: Fator de impacto 2020: 3.690).

Aceito em 29/09/2020.

DOI: 10.1016/j.jep.2020.113440

Aqueous extract from leaves of *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. relieves pain without genotoxicity activity

Lidiane Schultz Branquinho<sup>a</sup>, Maria Helena Verdan<sup>b,\*</sup>, Elisangela dos Santos<sup>a</sup>, Silvia Cordeiro das Neves<sup>c</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>c</sup>, Cláudia Andrea Lima Cardoso<sup>b,d</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>b</sup>*Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Grande Dourados – Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>c</sup>*Federal University of Mato Grosso do Sul – Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>d</sup>*Center of Studies in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.*

\* mhelenaverdan@gmail.com

**List of email addresses:**

**Lidiane Schultz Branquinho:** lidi.schultz@gmail.com

**Maria Helena Verdan:** mhelenaverdan@gmail.com

**Elisangela dos Santos:** elisangelaprocopiosan@gmail.com

**Silvia Cordeiro das Neves:** neves.silvia@gmail.com

**Rodrigo Juliano Oliveira:** rjo.rodrigojulianooliveira@gmail.com

**Cláudia Andrea Lima Cardoso:** claudiacardosouems1@gmail.com

**Cândida Aparecida Leite Kassuya:** candida2005@gmail.com

## ABSTRACT

*Ethnopharmacological relevance:* In the State of Mato Grosso do Sul, the watery sap of *Doliocarpus dentatus* is used to alleviate thirst, and the leaves of this species are used to relieve pain and swelling associated with inflammatory processes.

*Aim of the study:* This study aimed to analyze the compounds of the leaves from the aqueous extract of *D. dentatus* (EADd) and evaluate its toxicogenetic and pain relief effects in animal models.

*Materials and Methods:* Compounds were identified in EADd by UHPLC-HRMS (Ultra high-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry). The oral dose of 17 mg/kg EADd, calculated according to ethnopharmacological uses, and doses between 30–300 mg/kg were used to test *Swiss* mice in formalin- and acetic acid-induced models of pain and behavior. EADd (100–2000 mg/kg) was assayed in mice by comet, micronucleus, and phagocytosis tests and by peripheral leukocyte counts.

*Results:* Phenolic compounds and flavonoids as well as trigonelline and isoquercetin were identified in EADd. All oral doses of EADd exhibited antinociceptive activity, as indicated by a decrease in pain in both phases, a decrease in cold hypersensitivity induced by formalin, and a decrease in abdominal contortions induced by acetic acid. EADd did not alter the exploratory, motor or motivational activities of the animals. The comet and micronucleus tests indicated that EADd was not genotoxic and did not change the phagocytic activity or peripheral leukocyte count.

*Conclusions:* These results demonstrate that EADd could act as an antinociceptive agent that does not present genotoxicity. This study should contribute to justifying, in part, the popular use of *D. dentatus* in pain management, ensuring its safe use.

**Keywords:** *Doliocarpus dentatus*, pain, genotoxicity, phagocytosis, chemical composition.

## 1 Introduction

Brazilian *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. (Dilleniaceae) is known as “cipó-vermelho” and is found in the Cerrado and Amazon regions (Rodrigues and Carvalho, 2001). Popularly, the watery sap of this species is used to alleviate thirst, and its leaves are used to relieve pain and swelling associated with inflammatory processes (Rodrigues and Carvalho, 2001; Rodrigues, 2007; Jagessar and Persid, 2014). This plant is also used to treat hemorrhoids (Bieski et al., 2015) used as a diuretic (Ribeiro et al., 2017) and used to stop the symptoms of malaria (Ramírez and Blair, 2017).

Phytochemical studies with different extracts of *D. dentatus* showed the presence of steroids, coumarins, triterpenes, flavones, tannins, lactones, anthrasenosides, trigonelline, and betulinic acid (Jagessar et al., 2013), while phenols, flavonoids, tannins, betulinic acid, betulin, sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside and kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside were revealed in an ethanolic extract of the leaves (Ishikawa et al., 2017).

The biological properties of *D. dentatus* are leishmanicidal (Sauvain *et al.*, 1996), antimicrobial (Jagessar and Persid, 2014), antimycobacterial, and cytotoxic (Aponte et al., 2008). Ishikawa et al. (2017) demonstrated that the ethanolic extract of the leaves of *D. dentatus* has anti-inflammatory and antimycobacterial activities and suggested (Ishikawa et al., 2018) that it is safe to take this extract during the gestational period because it does not cause DNA damage, does not affect embryo-fetal development and is not teratogenic.

Thus, the objective of this study was to analyze the chemical composition of the aqueous extract from the leaves of *D. dentatus* to indicate its popular use against pain in animal models and evaluate its toxicogenetics.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Plant Material and Extract Preparation

Leaves of *D. dentatus* were collected at Campo Grande (Mato Grosso do Sul, Brazil) (20° 29' 59.6" S, 54° 36' 46.1" W) on March 9, 2018. The species was identified by Dr. Arnildo Pott and a voucher was deposited (CGMS49860) at the herbarium of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). Registration to access the Brazilian genetic heritage was performed at SisGen under the number A32F98E.

Leaves were dried at 40 °C and then ground. The powder was extracted with water by infusion performed in the same way as that of folk medicine, with 35.0 g of the dry material to 1 L of boiling water (Rodrigues, 2007). The mixture was closed for 30 min and then filtered. The extract was lyophilized, resulting in 1.82 g of crude aqueous extract that was named EADd, which represents a 5.2% (m/m) yield with respect to the dry leaf mass.

## 2.2 Chemical composition

Compounds were identified in the crude extract by UHPLC-HRMS. The extract was solubilized in ultrapure water (10.0 mg/mL) and then filtered through Chromafil Xtra PA-20/25 filters with a pore size of 0.2 µm (Macherey-Nagel®). Five microliters of the sample was injected into a UHPLC chromatograph (Shimadzu LC-20A Prominence Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The method employed acidified water (0.1% formic acid, v/v, phase A) and acetonitrile (phase B) as the mobile phase as follows: 0 min, 3% B; 8 min, 3% B; 30 min, 25% B; 60 min, 80% B; and 70 min, 3% B, with a flow rate of 0.30 mL/min. A Shim-pack XR-ODS column (2.20 µm particle size, 12.5 nm pore size, 75 mm in length and 2.0 mm internal diameter) was employed. The UHPLC system was coupled to a high-resolution mass detector (micrOTOF-Q™ III, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) using an electrospray ionization source (ESI) operating in positive ion mode. The  $m/z$  range was 50 to 1200 Da, the temperature of N<sub>2</sub> was 250 °C and was used at a flow rate of 9.0 L/min, and the capillary voltage was 4500 V. An automatized fragmentation method (auto-MS<sup>n</sup>) was

employed for each peak with an intensity greater than  $5.0 \times 10^5$ . Data were processed with Data Analysis 4.4. software. Later, the data were added to the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) database, where it was compared to all publicly available data (Wang et al., 2016).

The content of phenolic compounds and flavonoids was determined based on the procedure of Djeridane and coauthors (2006). The crude extract was solubilized in ultrapure water to result in a 1.0 mg/mL solution. The absorbance of the samples was measured at 760 and 430 nm for phenolic compounds and flavonoids, respectively, using a Global Trade Technology – UV-5200 spectrophotometer. A calibration curve was prepared with gallic acid ranging from 5.0 to 1000.0  $\mu\text{g/mL}$  for the content of phenolic compounds and using rutin (1.0 – 50.0  $\mu\text{g/mL}$ ) for the flavonoid content. All experiments were performed in triplicate. The results are expressed as  $\mu\text{g}$  of gallic acid per mg of the lyophilized extract (phenolic content) and expressed as  $\mu\text{g}$  of rutin per mg of the lyophilized extract (flavonoid content).

### **2.3 Animals and Drug preparation for the *in vivo* assay**

For toxicogenetic studies, male *Swiss* mice (approximately 40 g) from the Central Animal Facility of the Center for Biological Sciences and Health of UFMS were used. For pain assays, male *Swiss* mice (approximately 30 g) from the Central Biotherium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD) were used. The research was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation from UFMS (965/2018) and UFGD (39/2017). The animals were kept in polypropylene boxes at approximately 22 °C and 55% relative humidity in air conditioning. They were fed and received filtered water *ad libitum*.

The aqueous extract of *D. dentatus* (EADd) was dissolved in saline solution for *in vivo* assays. The dose of 17 mg/kg was calculated according to ethnopharmacological use. Considering that a 70 kg person takes 1.19 g of substance according to the preparation



indication of the tea divided into 3 doses of 220 mL, this is equivalent to a consumption of 17.0 mg/kg. This value of 1.19 g is in accordance with the yield of the aqueous extract from the leaves of *D. dentatus*.

#### **2.4 Formalin test**

The formalin test was done based on Hunskaar and Hole (1987) and, Yoon et al. (1994). Male mice were divided into 5 groups (n=6/group) to test orally EADd in three doses (30, 100 and 300 mg/kg); morphine was administered intraperitoneally as the positive control (5 mg/kg), and the negative control group received 0.9% saline (vehicle) orally.

#### **2.5 Abdominal contortions induced by acetic acid**

Abdominal contortions induced by acetic acid experiments were done as by Whittle (1964) and Queiroz, and coauthors (2010). Animals were divided into groups and treated orally with EADd (17 or 100 mg/kg) one hour before intraperitoneal injection of 0.8% acetic acid (0.1 mL/10 g) diluted in saline (0.9%). The negative control group received saline (0.9%), and the positive control group received morphine (5 mg/kg, i.p.).

#### **2.6 Open Field test**

The open field is made of a circular white arena 50 cm in diameter and 40 cm in height, divided with grids and crossings of 100 cm<sup>2</sup>. The doses tested orally in this assay were 17 or 100 mg/kg. Parameters such as the number of squares crossed at the center and at the periphery of the arena, supported rears, number of auto cleanings and number of fecal boils were recorded (Piccinelli et al., 2015).

#### **2.7 Tail Suspension test**

For the tail suspension test, the method employed was the one done by Steru and collaborators (1985).

## **2.8 Toxicogenetic evaluation**

Mice were divided into 5 groups (n=5/group) to orally administered EADd at 3 different doses (100, 1000 and 2000 mg/kg). Cyclophosphamide (positive control) was administered intraperitoneally (100 mg/kg), and in the negative control group, the animals were treated intraperitoneally with pure water at the dose of 0.1 mL/10 g body weight (b.w.).

## **2.9 Peripheral blood Comet assay**

Analyses were performed according to Singh et al. (1988) and Carvalho et al. (2015) by epifluorescence microscopy (Bioval®, Model L 2000A, São Paulo, Brazil) with a 40× objective, 420-490 nm excitation and a 520 nm barrier filter. In total, 200 cells/animal were visualized, and DNA fragment migration was determined according to comet class (Kobayashi, 1995, Oliveira et al., 2015).

## **2.10 Peripheral blood Micronucleus assay**

Two thousand cells/animal were analyzed under a fluorescence microscope (BIOVAL®, L Model 2000A) with a 420–490 nm excitation filter and 520 nm barrier filter (Hayashi et al. 1990, Carvalho et al. 2015).

## **2.11 Splenic phagocytosis assay**

Epifluorescence microscopy analyses of 200 cells per animal were conducted as described by Carvalho et al. (2015) using a fluorescence microscope with a 40× objective, 420-490 nm excitation filter and 520 nm barrier filter (Bioval®, Model L 2000A, São Paulo, Brazil).

## 2.12 Statistical analysis

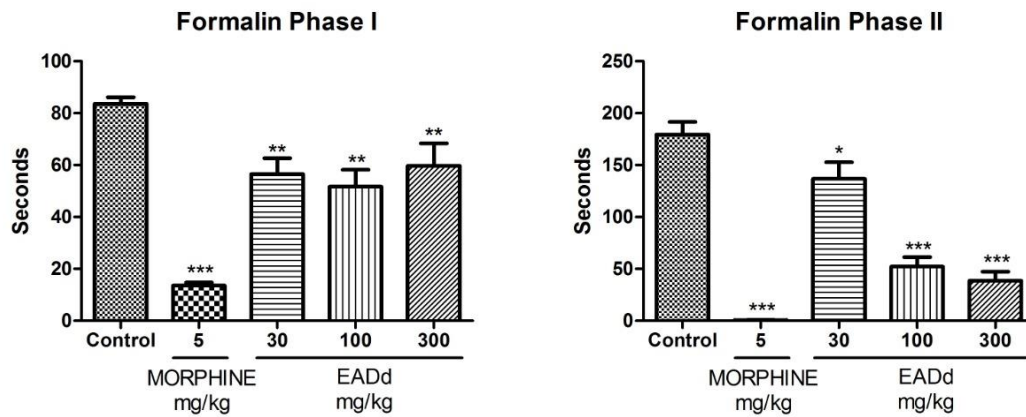
The values are expressed as the value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) or percentage. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Newman-Keuls post hoc test using GraphPad Prism software (version 3.02; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The significance level adopted was  $p < 0.05$ .

## 3 Results

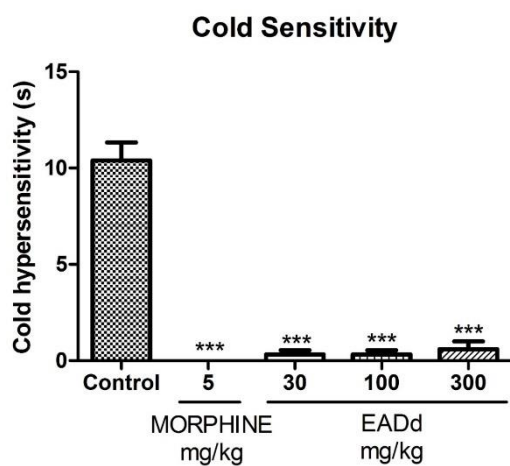
The contents of phenolic compounds and flavonoids in the crude aqueous extract of *D. dentatus* were determined to be  $98.67 \pm 2.01$   $\mu\text{g}$  of gallic acid per mg of the lyophilized extract and  $33.4 \pm 1.39$   $\mu\text{g}$  of rutin per mg of the lyophilized extract. Analysis of the chemical profile of the aqueous extract of *D. dentatus* by UHPLC/HRMS in the positive mode was performed at GNPS. All MS/MS data of EADd were compared with the data from the GNPS and resulted in 106 hits. From these, in order to prevent false annotations, after the data were checked manually, two compounds were identified in EADd: trigonelline ( $m/z$  138.06  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $t_R$  8.14 min) and isoquercetin ( $m/z$  465.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $t_R$  8.80 min). Isoquercetin was identified by the presence of the fragment ion at  $m/z$  303.05 ( $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ ) (Dong et al., 2017), and trigonelline was identified by the fragment ions at  $m/z$  94.06 ( $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$ ) and  $m/z$  110.06 ( $[\text{M}-\text{CO}]^+$ ) (Wood et al., 2002) in the MS/MS spectra.

In both phases, a reduction of the nociceptive behavior by formalin was observed. In the first phase, the doses of 30, 100 and 300 mg/kg EADd decreased the paw licking by  $32 \pm 7$ ,  $38 \pm 8$ , and  $29 \pm 10$ , respectively, and decreased the paw licking by  $24 \pm 9$ ,  $71 \pm 5$ , and  $78 \pm 5\%$  in the second phase, respectively, compared to the negative control. Morphine reduced paw licking by  $84 \pm 1\%$  in the first phase and 100% in the second phase (Fig. 1). Treatment with EADd significantly decreased cold hypersensitivity after formalin injection, with a maximum

inhibition of  $97\pm 2\%$ . Morphine treatment totally inhibited the cold sensitivity induced by formalin (Fig. 2).



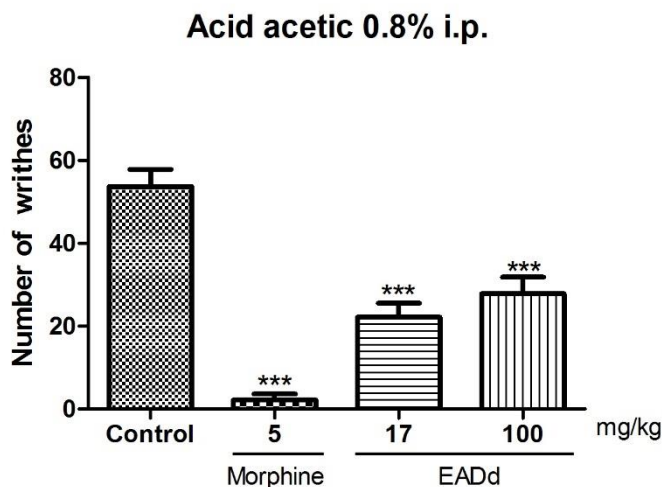
**Fig. 1.** Effects of EADd oral administration in the formalin test. The animals received EADd (30-300 mg/kg) and vehicle (control) orally, while morphine (5 mg/kg) was given intraperitoneally. One hour later, a formalin injection was administered. Each bar represents the average  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  indicate significant differences from the control group. Statistical Test: ANOVA followed by the Newman-Keuls test.



**Fig. 2.** Effect of oral administration of EADd on acetone-induced cold sensitivity in the formalin test. Animals received EADd and vehicle (control) orally, while morphine (5 mg/kg)

was intraperitoneally administered. Cold sensitivity was measured 30 min after formalin administration. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \*\*\* $p$ <0.001 compared to the control group. Statistical Test: ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

The results demonstrated the antinociceptive effect of EADd on the abdominal contortions induced by acetic acid. The number of contortions was reduced by  $41\pm 3$  and  $27\pm 4\%$  at doses 17 and 100 mg/kg, respectively, while morphine reduced  $96\pm 3\%$  of the contortions provoked by acetic acid (Fig. 3).

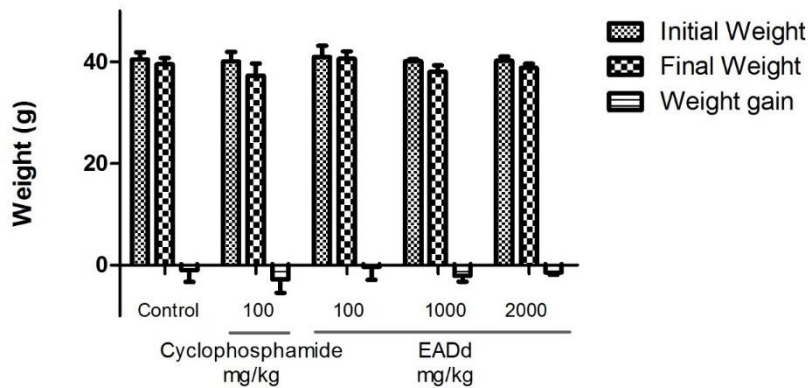


**Fig. 3.** Effect of oral administration of EADd on the acetic acid-induced abdominal writhing test. Animals received EADd (17 and 100 mg/kg v.o.), and vehicle (control) orally, while morphine (5 mg/kg) was intraperitoneally administered. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \*\*\* $p$ <0.0001 when compared to the control group. Statistical Test: ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

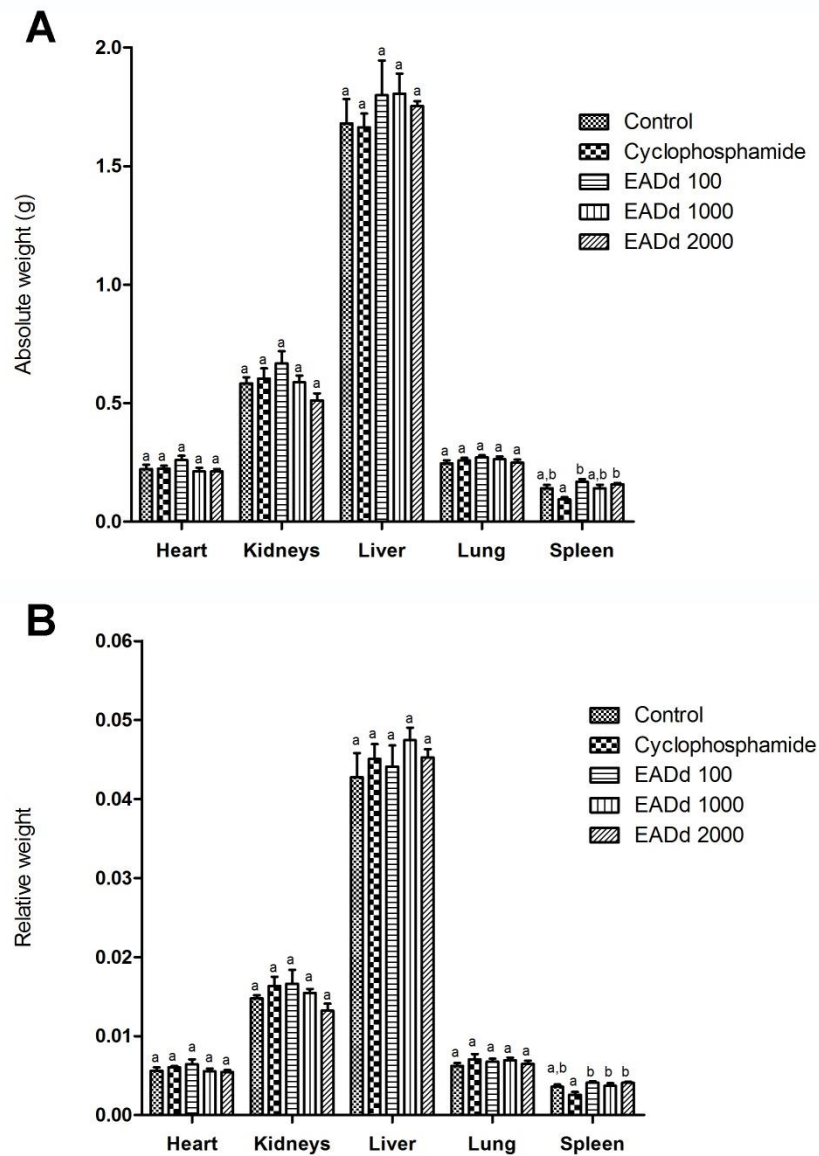
Animals were submitted to the open field test to evaluate motor and exploratory functions after the oral administration of EADd and to the tail suspension test to evaluate depressive behavior. No differences in the number of squares crossed by the animals were

observed, and there were no differences in the period of immobility of the groups of animals that were administered EADd compared to the negative control. These results showed that treatment with EADd did not compromise the exploratory, motor or motivational activities of the animals.

Animals from all groups started the toxicogenetic experiment with similar weights. Treatment with EADd did not alter the final weight or weight gain (Fig. 4). Additionally, the absolute and relative weights of the heart, lung, liver, spleen and kidneys did not show significant differences between the experimental groups and control group (Fig. 5).



**Fig. 4.** Biometric parameters of male mice. Animals were treated with vehicle (control), cyclophosphamide (100 mg/kg, b.w., i.p.) and EADd (100-2000 mg/kg, b.w., p.o.). The results are presented as the mean  $\pm$  SEM.  $p > 0.05$ . Statistical Test: ANOVA followed by the Tukey's test.



**Fig. 5.** Mean values of the absolute (A) and relative (B) organ weights of male mice. Animals were treated with vehicle (control), cyclophosphamide (100 mg/kg, b.w., i.p.) and EADd (100-2000 mg/kg, b.w., p.o.). The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. The letters "a" and "b" indicate significant differences between the experimental groups,  $p > 0.05$ . Statistical Test: ANOVA followed by the Tukey's test.

The frequency of damage to the DNA, evaluated by the comet assay, demonstrated that the groups treated with 100, 1000 and 2000 mg/kg EADd induced the same frequency of

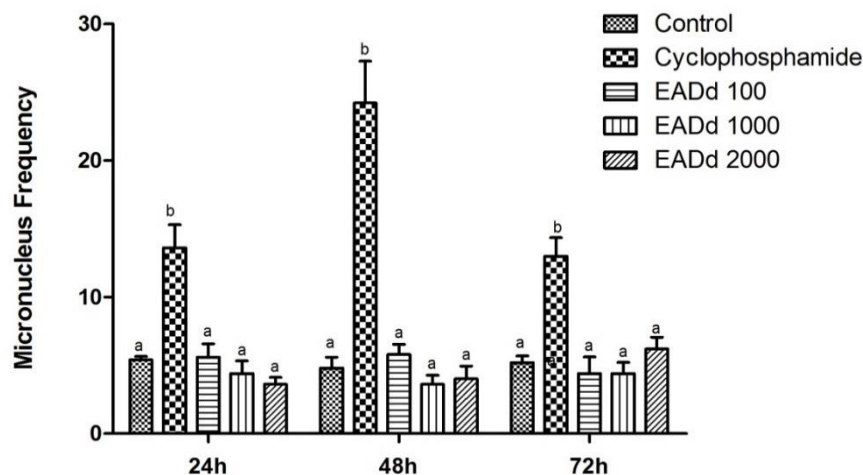
damage to cells as the control group, indicating that EADd does not present genotoxicity at the tested doses (Table 1).

**Table 1.** Mean values of the frequency of cells with DNA damage, the distribution between the classes of damage and scores from the comet assay in mice treated with EADd.

Experimental groups	Damage	Class				Score
		0	1	2	3	
Control	10.00±2.19 <sup>a</sup>	190.00±2.19	10.00±2.19	0.00±0.00	0.00±0.00	10.00±2.19 <sup>a</sup>
Cyclophosphamide	126.80±14.56 <sup>b</sup>	73.60±1.28	119.20±12.77	7.60±0.00	0.00±0.00	134.40±16.5 <sup>b</sup>
EADd 100	21.40±5.21 <sup>a</sup>	178.60±5.21	21.40±5.21	0.00±0.00	0.00±0.00	21.40±5.21 <sup>a</sup>
EADd 1000	27.60±7.19 <sup>a</sup>	172.40±7.19	27.4±7.19	0.00±0.00	0.00±0.00	27.60±7.19 <sup>a</sup>
EADd 2000	22.00±2.84 <sup>a</sup>	178.00±2.85	22.00±2.84	0.00±0.00	0.00±0.00	22.00±2.85 <sup>a</sup>

The results are presented as the mean ± SEM. The letters "a" and "b" indicate significant differences between experimental groups. Statistical Test: ANOVA followed by Tukey's test.

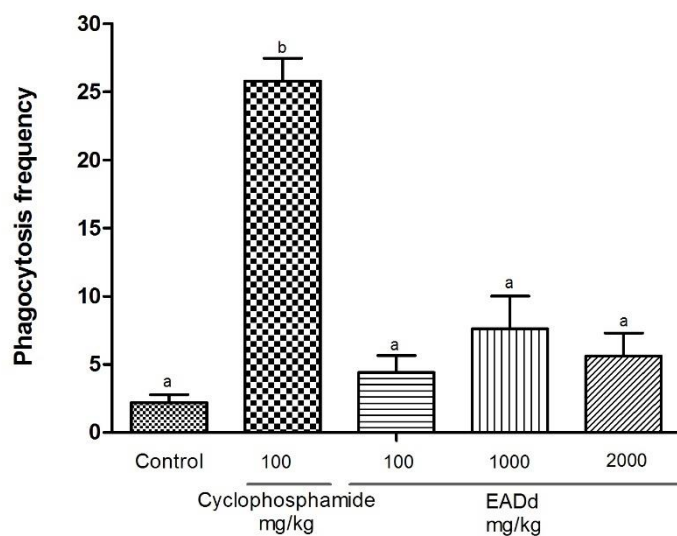
The micronucleus assay indicated that the frequency of chromosomal damage was not altered between the groups treated with 100, 1000 and 2000 mg/kg EADd and the control group. Between the times of analysis, no significant differences were observed, which indicates that EADd does not have a cumulative effect (Fig. 6).





**Fig. 6.** Frequency of micronuclei analyzed in male mice treated with vehicle (control), cyclophosphamide (100 mg/kg, b.w., i.p.) and EADd (100-2000 mg/kg, b.w., p.o.). The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. The letters "a" and "b" indicate significant differences between the experimental groups,  $p < 0.05$ . Statistical Test: ANOVA followed by Tukey's test.

The frequency of splenic phagocytosis was not significantly different between the groups treated with EADd and the control group, demonstrating that there was no increase in phagocytic activity (Fig. 7).



**Fig. 7.** Frequency of splenic phagocytosis in male mice treated with vehicle (control), cyclophosphamide (100 mg/kg, b.w., i.p.) and EADd (100-2000 mg/kg, b.w., p.o.). The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. The letters "a" and "b" indicate significant differences between the experimental groups,  $p > 0.05$ . Statistical Test: ANOVA followed by Tukey's test.

#### 4 Discussion

The present study determined that the contents of flavonoids and phenolic compounds in the aqueous extract were below the values observed by Ishikawa and coworkers (2017) for the ethanolic extract of the leaves from *Doliocarpus dentatus*: 204.04±3.2 mg of gallic acid per g of extract and 89.17±1.7 mg of quercetin per g of extract (Ishikawa et al., 2017). This is because ethanol is a more versatile solvent and extractions performed with ethanol are more exhaustive; furthermore, the extraction was performed for 7 consecutive days, therefore extracting more compounds in higher amounts (Ishikawa et al., 2017).

Both compounds were identified by comparison of their MS/MS spectra with the libraries available from the GNPS. Trigonelline had already been isolated from *D. dentatus*, showing that some of the compounds occur in different samples that were collected in different locations and seasons. Trigonelline was isolated from Jagessar and coworkers (2013) from the ethyl acetate extract of the stems of *D. dentatus* that were collected in Guyana. Trigonelline is a pyridine alkaloid commonly found in seeds, and its primary source is *Coffea arabica* and *C. canephora* (Ky et al., 2001), but this compound has also been isolated from other species (*Phaseolus aureus* (Zheng et al., 2005), *Trigonella foenum-graecum* (Dar et al., 2015), and *Balanites aegyptiaca* (Farang et al., 2015)). Trigonelline possesses many biological activities (Yoshinari and Igarashi, 2010, Zhou et al., 2012), including reducing hepatic steatosis (Zhang et al., 2015), anti-invasive activity in hepatoma cells (Hirakawa et al., 2005), and others (Ashihara et al., 2015).

On the other hand, this is the first report of isoquercetin from *D. dentatus*. Flavonoid glycosides are common compounds in this species, and vitexin, isovitexin (Gurni and Kubitzki, 1981) and kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyroside have been found (Ishikawa et al., 2017). Isoquercetin is a secondary metabolite very known for its antioxidant activity, similar to many other flavonoids (Rice-evans et al., 1995, Procházková et al., 2011, Li et al., 2016); it also does not cause *in vivo* DNA damage (Pak et al., 2016), has antidiabetic properties (Zhang

et al., 2011), and is a potent agent for the treatment of influenza virus infection (Kim et al., 2010). Lupane terpenoids were previously identified in *D. dentatus* (Ishikawa, 2017); however, the presence of low polarity compounds in an aqueous extract is not expected.

The formalin test is a method used to test analgesic compounds (Khan et al., 2010). In this model, there are two distinct phases. The first phase (0-5 min) corresponds to neurogenic pain when formalin induces direct stimuli at nociceptive neurons and C fibers mediated by substance P, bradykinin, and glutamate, and the second phase (15-30 min) represents inflammatory pain (Dallel et al., 1995) as a result of the sensitization of nociceptors (prostaglandins, histamine, bradykinin and serotonin release) (Hunskar and Hole, 1987; Clavelou et al., 1995; Barrot, 2012). Opioids inhibit both phases, while nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit the late phase (Shibata et al., 1989; Damas and Liegeois, 1999). Treatment with high doses of EADd (100 and 300 mg/kg) in the formalin test reduced the pain response in both phases; however, a better effect was observed in the second phase, meaning that EADd is involved in peripheral and central pain mechanisms. Regarding the inhibitory performance of EADd, it can be suggested that EADd possesses analgesic and anti-inflammatory properties, indicating interactions between EADd and the cyclooxygenase (COX) system. Ishikawa et al. (2017) demonstrated that the ethanolic extract of *D. dentatus* had anti-inflammatory activity (100-300 mg/kg) with a reduction in leukocyte migration and formation of edema and hyperalgesia induced by carrageenan, which are important parameters for the evaluation of the anti-inflammatory activity and could involve prostaglandins and the nitric oxide (NO) system (Seibert et al., 1994).

Abdominal contortion induced by acetic acid releases histamine, bradykinin, eicosanoids and leukotrienes (Verma et al., 2005; Bahamonde et al., 2013, Oh et al., 2015). Acetic acid acts on cells at the abdominal cavity, inducing the release of cytokines, such as IL-1, IL-8 and TNF, increasing the release of glutamate and aspartate in the cerebrospinal

fluid (Feng et al., 2003) and inducing vasodilatation and vascular permeability (Verri et al., 2006; Parveen et al., 2007). Thus, the abdominal contortion test induced by acetic acid is used to evaluate drugs that decrease central pain, such as opioids and NSAIDs (Barrot, 2012; De Souza et al., 2012). Administration of EADd reduced the abdominal contortions induced by acetic acid in both phases, suggesting that EADd plays a role in prostaglandin synthesis. It is possible that the identified trigonelline and isoquercetin in EADd are the molecules responsible for the antinociceptive and anti-inflammatory effects presented by the extract. A previous study demonstrated that trigonelline suppressed inflammation in pregnant diabetic mice (Zhou et al., 2017). In addition, isoquercetin was correlated with the antinociceptive effects in abdominal contortion and formalin assays (Krogh et al., 1999; De Souza et al., 2007; Lin et al., 2009; Chen et al., 2018), which can justify, in part, the popular use of *D. dentatus* for the treatment of pain.

According to ANVISA (National Agency of Health Surveillance - 2013), genotoxicity tests are used to determine the toxicity of phytotherapeutic products. It is crucial to determine the safety of the usage of a medicinal plant in addition to its efficacy. *In vivo* genetic toxicity assays are used as models to evaluate DNA damage or chromosomal damage. Detection of a change, even if it is early, can indicate a tumor or other illnesses, and checking for such changes contributes to confirming the safe use of herbal products (Shin et al., 2020; Ishikawa et al., 2017; Cardoso et al., 2016).

Genetic assays in mice treated with EADd did not reveal significant differences in cell damage. The micronucleus assay was used to determine genotoxicity, as the comet assay contributes to pharmacokinetic evaluation, experimental metabolism and DNA processing (Ishikawa et al., 2017; Morita et al., 2016; OECD, 2014).

The biometric parameters do not indicate toxicity because alterations were not observed in the body weights or in the absolute or relative weights of the organs compared to

the control group (Vani et al., 2018; David et al., 2014). The low frequency of phagocytosis reinforces the lack of genotoxicity in mice treated with EADd. Usually, phagocytic activity happens when there are cells with damaged DNA (Oliveira et al., 2018).

As observed by Ishikawa and coworkers (2017), for the ethanolic extract from the leaves of *D. dentatus*, this study showed that an aqueous extract of *D. dentatus* did not alter the observed parameters, suggesting that EADd does not have genotoxic potential or altered splenic phagocytosis at the tested doses of 100, 1000 and 2000 mg/kg, which suggests safety for therapeutic usage, taking care to not exceed the tested doses.

## **5 Conclusion**

This study demonstrates that the ethnopharmacological dose of the aqueous extract from the leaves of *Doliocarpus dentatus* and other doses decreased the pain response, indicating analgesic and anti-inflammatory actions. Furthermore, toxicogenetic assays determined that EADd does not have genotoxic potential and does not modify splenic phagocytosis.

## **Acknowledgments**

MHV, ES and SCN thank CAPES for the scholarship (Finance code 001) and CALC Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concession number 311975/2018-6) and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) (concession number 71/700.139/2018 ; 036/20108 and SIAFEM 028991)

## **Funding**

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

### **Authors contributions**

**L. S. Branquinho:** Elaboration and execution of the experiments (abdominal contortions induced by acetic acid, formalin, open field, and tail suspension tests); analysis of the data; writing the original draft.

**M. H. Verdan:** Elaboration and execution of the experiments (harvesting of the vegetal material, extract preparation, chemical composition determination); execution of the pain experiments (abdominal contortions induced by acetic acid, formalin, open field, and tail suspension tests); analysis of the data; writing the original draft.

**E. dos Santos:** Execution of the pain experiments (abdominal contortions induced by acetic acid, formalin, open field, and tail suspension tests).

**S. C. das Neves:** Elaboration and execution of the experiments (toxicogenetic evaluation, peripheral blood Comet assay, peripheral blood Micronucleus assay, splenic phagocytosis assay); analysis of the data; writing the original draft.

**R. J. Oliveira:** Support of infrastructure to perform the toxicogenetic experiments, discussion of the results, revision of the manuscript.

**C. A. L. Cardoso:** Support of infrastructure to perform the chemical experiments, discussion of the results, revision of the manuscript.

**C. A. L. Kassuya:** Support of infrastructure to perform the pain experiments, discussion of the results, revision of the manuscript.

### **References**

ANVISA, National Agency of Health Surveillance. 2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF. Brasil.

Aponte, J.C., Vaisberg, A.J., Rojas, R., Caviedes, L., Lewis, W.H., Lamas, G., Sarasara, C., Gilman, R.H., Hammond, G.B. 2008. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. *J. Nat. Prod.* 71, 102-105. <https://doi.org/10.1021/np070560c>

Ashihara, H., Ludwig, I.A., Katahira, R., Yokota, T., Fujimura, T., Crozier, A. 2015. Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health. *Phytochem. Rev.* 14, 765-798. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9375-z>

Bahamonde, S.M.A., Flores, M.L., Córdoba, O.L., Taira, C.A., Gorzalczany, S. 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliotrichum diffusum*. *Rev. Brasil. Farmacognosia* 23, 699-705. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000051>

Barrot, M. 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211, 39-50.

Bieski, I.G.C.; Leonti, M.; Arnason, J.T.; Ferrier, J.; Rapinski, M.; Violante, I.M.P.; Balogun, S.O.; Pereira, J.F.C.A.; Figueiredo, R.D.C.F.; Lopes, C.R.A.S. 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of valley of Juruena region, legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 173, 383-423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.025>

Cardoso, V.D.S., Vermelho, A., Lima, C.R.D., Oliveira, J.M.D., Lima, M.F.D., Silva, L.P.D., Direito, G., Danelli, M.M. 2016. Antigenotoxic Effect of Piperine in Broiler Chickens Intoxicated with Aflatoxin B1. *Toxins*. 8, 316. DOI: 10.3390/toxins8110316

Carvalho, P.C., Santos, E.A., Schneider, B.U.C., Matuo, R., Pesarini, J.R., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Lima, D.P., Antonioli, A.C.M.B., Oliveira, R.J., 2015. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations

and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 715–721. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.028>

Chen, H., Yu, W., Chen, G., Meng, S., Xiang, Z., He, N. 2018. Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. *Molecules* 23, 4. DOI: 10.3390/molecules23010004.

Clavelou, P., Dallel, R., Orliaguet, T., Woda, A., Raboisson, P. 1995. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain* 62, 295-301. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00273-H](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00273-H)

Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M., Woda, A. 1995. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain* 61, 11-16. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00212-W](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00212-W)

Damas, J., Liegeois, J.F. 1999. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359, 220-227.

Dar, T.A., Uddin, M., Khan, M.M.A., Ali, A., Hashmi, N., Idrees, M. 2015. Cumulative effect of gibberellic acid and phosphorus on crop productivity, biochemical activities and trigonelline production in *Trigonella foenum-graecum* L. *Cogent Food & Agriculture*, 1, 995950. <https://doi.org/10.1080/23311932.2014.995950>

David, N.D., Mauro, M.D.O., Gonçalves, C.A., Pesarini, J.R., Strapasson, R.L.B., Kassuya, C.A.L., Stefanello, M.É.A., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Oliveira, R.J. 2014. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* 154, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.005>

De Queiroz, A.C.; De Lira, D.P.; Dias, T.D.L.M.F.; De Souza, É.T.; Da Matta, C.B.B.; De Aquino, A.B.; Silva, L.H.A.C.; Da Silva, D.J.C.; Mella, E.A.C.; De Fátima Agra, M. 2010.



The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea*

Benth.(Fabaceae). J. Ethnopharmacol. 128, 377-383.

De Souza, M.T., De Campos Buzzi, F., Cechinel Filho, V., Hess, S., Delle Monache, F., Niero, R. 2007. Phytochemical and antinociceptive properties of *Matayba elaeagnoides* Radlk. barks. Z. Naturforsch., C: J. Biosci. 62, 550-554. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-814>

De Souza, G.F.P., Zarpelon, A.C., Tedeschi, G.C., Mizokami, S.S., Sanson, J.S., Cunha, T.M., Ferreira S.H., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri Jr, W.A. 2012. Acetic acid-and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI<sub>3</sub>K and microglia in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 101, 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.01.018>

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem. 97, 654-660.

Dong, R., Su, J., Nian, H., Shen, H., Zhai, X., Xin, H., Qin, L., Han, T. 2017. Chemical fingerprint and quantitative analysis of flavonoids for quality control of *Sea buckthorn* leaves by HPLC and UHPLC-ESI-QTOF-MS. J. Funct. Foods. 37, 513-522. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.019>

Farag, M.A., Porzel, A., Wessjohann, L.A. 2015. Unraveling the active hypoglycemic agent trigonelline in *Balanites aegyptiaca* date fruit using metabolite fingerprinting by NMR. J. Pharm. Biomed. Anal. 115, 383-387. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.08.003

Feng, Y., Cui, M., Willis, W.D. 2003. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 98, 729-733. DOI: 10.1097/00000542-200303000-00023

Gurni, A.A., Kubitzki, K. 1981. Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 9, 109-114. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(81\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0305-1978(81)90028-4)

Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate-Junior, M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridina orange-coated slides. *Mut. Res.* 245, 245–249. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90222-L](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90222-L)

Hirakawa, N., Okauchi, R., Miura, Y., Yagasaki, K. 2005. Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 69, 653-658. DOI: 10.1271/bbb.69.653

Hunskar, S., Hole, K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30, 103-114. DOI: 10.1016/0304-3959(87)90088-1

Ishikawa, R.B., Leitão, M.M., Kassuya, R.M., Macorini, L.F., Moreira, F.M.F., Cardoso, C.A.L., Coelho, R.G., Pott, A., Gelfuso, G.M., Croda, J., Oliveira, R. J., Kassuya, C.A.L. 2017. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus dentatus*. *J. Ethnopharmacol.* 204, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.004>

Ishikawa, R.B., Vani, J.M., Das Neves, S.C., Rabacow, A.P.M., Kassuya, C.A.L., Croda, J., Cardoso, C.A.L., Monreal, A.C.D.F., Antonioli, A.C.M.B., Cunha-Laura, A.L., Oliveira, R.J. 2018. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. *J. Ethnopharmacol.* 217, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.034>

Jagessar, R.C., Hoolas, G., Maxwell, A.R. 2013. Phytochemical screening, isolation of betulinic acid, trigonelline and evaluation of heavy metals ion content of *Doliocarpus dentatus*. *J. Nat. Prod.* 6, 5-16.

Jagessar, R.C., Persid, R. 2014. Antimicrobial activity of uncombined and combined extracts of *Doliocarpus dentatus* and *Montrichardia arborescens*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 5, 286.

Khan, H., Saeed, M., Khan, M.A., Dar, A., Khan, I. 2010. The antinociceptive activity of *Polygonatum verticillatum* rhizomes in pain models. J. Ethnopharmacol. 127, 521-527. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.003>

Kim, Y., Narayanan, S., Chang, K.-O. 2010. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. Antiviral Res. 88, 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.08.016>

Kobayashi, H. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. MMS Commun. 3, 103-115.

Krogh, R., Kroth, R., Berti, C., Madeira, A.O., Souza, M.M., Cechinel-Filho, V., Monache, F.D., Yunes, R.A. 1999. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. Die pharmazie. 54, 464-466.

Ky, C.L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., Noirot, M. 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. Food Chem. 75, 223-230. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00204-7)

Li, X., Jiang, Q., Wang, T., Liu, J., Chen, D. 2016. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: Understanding the role of the 6''-OH group. Molecules, 21, 1246. <https://doi.org/10.3390/molecules21091246>

Lin, Y.C., Cheng, H.Y., Huang, T.H., Huang, H.W., Lee, Y.H., Peng, W.H. 2009. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Torenia concolor* Lindley var. *formosana* Yamazaki and betulin in mice. Am. J Chin. Med. 37, 97-111.

Morita, T., Hamada, S., Masumura, K., Wakata, A., Maniwa, J., Takasawa, H., Yasunaga, K., Hashizume, T., Honma, M. 2016. Evaluation of the sensitivity and specificity of *in vivo* erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent

carcinogens. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 802, 1–29.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.03.008>

Oh, Y.C., Jeong, Y., Cho, W.K., Ha, J.H., Gu, M., Ma, J. 2015. Anti-inflammatory and analgesic effects of pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xylene-induced ear edema. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1232-1251. <https://doi.org/10.3390/ijms16011232>

OECD, 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2014.

Oliveira, R.J., Mantovani, M.S., Pesarini, J.R., Mauro, M.O., Silva, A.F., Souza, T.R., Ribeiro, L.R., 2015. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development *in vivo*. *Genet Mol. Res.* 14, 834–849.

Oliveira, R.J., Santos, N.D.C.L., Pesarini, J.R., Oliveira, B.C.D., Berno, C.R., Araújo, F.H.S.D., Silveira, I.O.M.F., Nascimento, R.O., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Monreal, A.C.D., Beatriz, A., Lima, D.P.D., Gomes, R.D.S. 2018. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. *Genet. Mol. Biol.* 41, 154–166. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0091>

Pak, B., Han, S., Lee, J., Chung, Y. 2016. Evaluation of *in vivo* Genotoxicity of Plant Flavonoids, Quercetin and Isoquercetin. *J. Food Hyg. Saf.* 31, 356-364. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.5.356>

Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M.K., Dai, R., Ahamad, W., Yu, Y.H. 2007. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 127, 1275-1279. <https://doi.org/10.1248/yakushi.127.1275>

Piccinelli, A.C., Santos, J.A., Konkiewitz, E.C., Oesterreich, S.A., Formagio, A.S.N., Croda, J., Ziff, E.B., Kassuya, C.A.L. 2015. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutr. Neurosci.* 18, 217-224. <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000119>

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 82, 513-523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>

Ramírez, O.; Blair, S. 2017. Ethnobotany of Medicinal Plants Used to Treat Malaria by Traditional Healers from Ten Indigenous Colombian Communities Located in Vaupes Medio. *Biodivers. Int. J.* 1, 00022.

Ribeiro, R.V.; Bieski, I.G.C.; Balogun, S.O.; De Oliveira Martins, D.T. 2017. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 205, 69-102. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.023>

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. 1995. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radical Res.* 22, 375-383. <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>

Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.D. 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25, 102-123.

Rodrigues, V.E.G. 2007. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande, MG. Lavras, Minas Gerais. Universidade Federal de Lavras.

Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Dedet, J.P. 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother. Res.* 10, 1-4. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199602\)10](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199602)10)

Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12013-12017. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12013>

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38, 347-352. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4)

Shin, S., Yi, J.-M., Kim, N.S., Park, C.-S., Kim, S.-H., Bang, O.-S., 2020. Aqueous extract of *Forsythia viridissima* fruits: Acute oral toxicity and genotoxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* 249, 112381. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112381>

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

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 85, 367-370. <https://doi.org/10.1007/BF00428203>

Vani, J.M., Monreal, M.T.F.D., Auharek, S.A., Cunha-Laura, A.L., Arruda, E.J.D., Lima, A.R., Silva, C.M.D., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Lima, D.P.D., Beatriz, A., Oliveira, R.J. 2018. The mixture of cashew nut shell liquid and castor oil results in an efficient larvicide against *Aedes aegypti* that does not alter embryo-fetal development, reproductive performance or DNA integrity. *Plos One* 13. DOI: 10.1371/journal.pone.0193509

Verma, P.R., Joharapurkar, A.A., Chatpalliwar, V.A., Asnani, A.J. 2005. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. *J. Ethnopharmacol.* 102, 298-301. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.039>

Verri Jr, W.A., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. *Pharmacol. Ther.* 112, 116-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>

Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P.C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Muller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B., Pogliano, K., Linnington, R.G., Gutierrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C.,

Bandeira, N. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828.

Whittle, B.A. 1964. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *Int. J. Neuropharmacol.* 3, 369-378. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(64\)90066-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(64)90066-8)

Wood, K.V., Bonham, C.C., Miles, D., Rothwell, A.P., Peel, G., Wood, B.C., Rhodes, D. 2002. Characterization of betaines using electrospray MS/MS. *Phytochemistry.* 59, 759-765. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00049-3)

Yoon, C., Wook, Y.Y., Sik, N.H., Ho, K.S., Mo, C.J. 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain.* 59, 369-376. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90023-X)

Yoshinari, O., Igarashi, K. 2010. Anti-Diabetic Effect of Trigonelline and Nicotinic Acid, on KK-Ay Mice. *Curr. Med. Chem.* 17, 2196-2202. DOI: 10.2174/092986710791299902

Zhang, D.-F., Zhang, F., Zhang, J., Zhang, R.-M., Li, R. 2015. Protection effect of trigonelline on liver of rats with non-alcoholic fatty liver diseases. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 8, 651-654. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.07.012>

Zhang, R., Yao, Y., Wang, Y., Ren, G. 2011. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A y mice. *Nutr Metab.* 8, 85. DOI: 10.1186/1743-7075-8-85

Zheng, X.-Q., Hayashibe, E., Ashihara, H. 2005. Changes in trigonelline (N-methylnicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of mungbean (*Phaseolus aureus*) seeds. *J. Exp. Bot.* 56, 1615-1623. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri156>

Zhou, J., Chan, L., Zhou, S. 2012. Trigonelline: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Diabetes and Central Nervous System Disease. *Curr. Med. Chem.* 19, 3523-3531. DOI: 10.2174/092986712801323171



Zhou, J.Y., Du, X.H., Zhang, Z., Qian, G.S. 2017. Trigonelline Inhibits Inflammation and Protects  $\beta$  Cells to Prevent Fetal Growth Restriction during Pregnancy in a Mouse Model of Diabetes. *Pharmacology*. 100, 209-217. DOI: 10.1159/000479088

**Artigo 2: Anti-arthritic and Anti-nociceptive Potential of Ethanolic Extract from Leaves of *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. in Mouse Model**

Submetido à revista “Pharmacognosy Research” (Qualis B2 - Medicina II: Fator de impacto 2020: 1.63).

*Link* com as normas da revista: <http://www.phcogres.com/contributors.asp>

Aceito em 12/01/2021.

**Anti-arthritic and Anti-nociceptive Potential of Ethanolic Extract from Leaves of *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. in Mouse Model**

Lidiane Schultz Branquinho<sup>a</sup>, Maria Helena Verdan<sup>b,\*</sup>, Saulo Euclides da Silva-Filho<sup>c</sup>,

Rodrigo Juliano Oliveira<sup>c</sup>, Cláudia Andrea Lima Cardoso<sup>b,d</sup>, Arielle Cristina Arena<sup>e</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>b</sup>*Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Grande Dourados – Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>c</sup>*Federal University of Mato Grosso do Sul – Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>d</sup>*Center of Studies in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.*

<sup>e</sup>*Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP – Paulista State University - Botucatu, São Paulo State, Brazil*

\* mhelenaverdan@gmail.com

**ABSTRACT**

**Objectives:** The folk use of *Doliocarpus dentatus* for pain and inflammatory conditions has led our group to evaluate the anti-inflammatory, anti-nociceptive and anti-arthritic effects of its ethanol extract from the leaves (EEDd) on mouse models. **Methods and Results:** Oral treatments with EEDd (30, 100 or 300 mg/kg) significantly inhibited the formalin-induced nociceptive and cold sensitivity, prevented acetic acid-induced nociceptive behavior and prevented articular inflammation (including knee edema, leukocyte infiltration, mechanical hyperalgesia) induced by zymosan. In the peritonitis model, betulinic acid (BA, 0.3, 3 or 30

mg/kg) and EEDd (300 mg/kg) significantly inhibited zymosan-induced leukocyte infiltration. In the complete Freund adjuvant (CFA) model, oral treatments with EEDd (100 or 300 mg/kg) for 21 days, significantly inhibited mechanical hyperalgesia, cold response and edema. In the MTT viability assay, EEDd (3, 10, 30 or 90 µg/mL) did not induce leukocytes cytotoxicity. Male and female Swiss mice were used for the tests or, for the CFA test, C57BL/6 mice. **Conclusion:** This study demonstrates that EEDd exhibited anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic potential in mice and BA contribute for the EEDd observed activities.

**Key words:** *Doliocarpus dentatus*, Articular inflammation, Betulinic acid, Pain, Arthritis.

## INTRODUCTION

The inflammatory process and pain are necessary beneficial responses to preserve tissue integrity. However, the excessive release of inflammatory mediators can significantly affect the activities of the individual's daily life.<sup>[1]</sup> Currently, the clinical treatment of inflammation and pain involves drugs that have limited safety profiles and several side effects.<sup>[2]</sup> Medicinal plants are useful sources to develop new drugs to treat diseases.

*Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. (Dilleniaceae), popularly known as “cipó-vermelho” can be found in Mata Atlântica, Amazon forest and Cerrado biome of Brazil.<sup>[3,4]</sup> Leaves and roots of *D. dentatus* are used by the population to treat cystitis, pain and swelling associated with inflammation, as well as diuretic and laxative.<sup>[3,5]</sup> Scientific studies demonstrated that the chloroform extract of the whole plant of *D. dentatus* has leishmanicidal activity,<sup>[6]</sup> the diethyl ether extract from lianas were cytotoxic,<sup>[4]</sup> ethanolic extract from the leaves of *D. dentatus* (EEDd) presented anti-inflammatory and antimycobacterial activities.<sup>[7]</sup> Ishikawa and coworkers identified betulinic acid, betulin, kaempferol 3-*O*-β-L-rhamnopyranoside, sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside, quercetin and kaempferol at EEDd.<sup>[7,8]</sup>

Thus, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory, antiarthritic and antinociceptive potential, as well as the cell viability of the EEDd.

## MATERIALS AND METHODS

### *Vegetal material and extract preparation*

Leaves from *D. dentatus* were collected at Federal University of Mato Grosso do Sul (Campo Grande) and were identified by Prof. Dr. Arnildo Pott. A specimen was deposited at UFMS herbarium (Number 49860) and the registration number in the National System for the Management of Genetic Heritage is A2CF88A. EEDd was prepared as described by Ishikawa and coworkers.<sup>[7]</sup>

### ***Chemical reagents***

Betulinic acid, zymosan, CFA, MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), were brought from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The other reagents were acquired from good quality suppliers.

### ***Animals***

Male or female *Swiss* mice (30 g,  $n=110$  and 36 respectively) or male C57BL/6 mice (25 g,  $n=24$ ) were used and maintained in polypropylene boxes at the biotherium of the Health Sciences Faculty of UFGD, with controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and relative humidity ( $55 \pm 10\%$ ). Animals feed and water were provided *ad libitum*. This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFGD (39/2017).

### ***Experimental design of the treatments***

1 hr before experimental procedures, mice were distributed in groups ( $n=6/\text{group}$ ) for all assays and received the samples in doses as follows: Groups 1 and 2 EEDd with 100 and 300 mg/kg, p.o., respectively; Group 3 vehicle (p.o., negative control). The positive control for Group 4 in experiments of formalin and acetic acid-induced abdominal contortions tests was morphine (5 mg/kg, i.p.). For zymosan-induced articular inflammation and CFA models, dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) was used as positive control. In the peritonitis model, BA was tested at doses of 0.3, 3 and 30 mg/kg. For the formalin test, the dose of 30 mg/kg of EEDd was also tested to observe if extract has dose response efficacy.

### ***Formalin test***

After 1 hr of treatments, male *Swiss* mice received 20  $\mu\text{L}$  of sterile saline with 2.5% of formalin into the right paw.<sup>[9]</sup> Subsequently, animals were placed individually in glass funnels and they were observed for paw licking from 0 to 5 min (phase 1 - neurogenic) and 15 to 30 min (phase 2 - inflammatory). In the sequence, the cold sensibility was determined by the acetone drop method.<sup>[10]</sup>

### ***Acetic acid-induced abdominal contortions***

1 hr after the treatments, the amount of 0.8% of acetic acid (0.1 mL, i.p.) diluted in saline (0.9%) was injected in male *Swiss* mice. The number of abdominal contortions was observed in the sequence for 20 min.

### ***Complete Freund adjuvant model***

The animals received the treatments cited at the experimental design, daily, for 21 days. After first treatments, male C57BL/6 mice received an injection of 20  $\mu\text{L}$  of CFA at the right paw.<sup>[11]</sup> The tests of mechanical hyperalgesia, paw edema measurement and cold sensibility

were performed at days 5, 10, 15 and 21 after CFA injection according to Kuraoka-Oliveira study.<sup>[12]</sup>

### ***Zymosan-induced articular inflammation***

The female *Swiss* mice of each treatment group received intra-articular injection of 20  $\mu$ L of zymosan (200  $\mu$ g/articulation) at the posterior right knee by the suprapatellar ligament.<sup>[13]</sup> 3 and 4 hr after zymosan injection, the paw lifting was measured using an electronic analgesimeter (InSight®). With the help of a digital micrometer (Mitotoyo®), the knee edema was determined by measuring the difference of the right and left knee diameter ( $\mu$ m) after 4 and 6 hr of zymosan injection. After 6 hr of zymosan injection, animals were euthanized with an overdose of ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.) and the knee articulation cavities were washed with 10  $\mu$ L of PBS/EDTA.

### ***Zymosan-induced peritonitis***

The male *Swiss* mice of each treatment group received an injection of 200  $\mu$ L of zymosan (1 mg/cavity, i.p.).<sup>[14]</sup> Animals were euthanized with an overdose of inhaled isoflurane (1.5%) after six hours and cells present at peritoneal cavity were collected by introducing 1 mL of PBS/EDTA. Leukocytes counts were performed with the help of a hematology analyzer (KX-21N Sysmex) and the nitric oxide (NO) concentration was determined according to Griess method.<sup>[15]</sup>

### ***Cell viability analysis by MTT***

Leukocytes were obtained from the male mice peritoneal cavities after 4 hr of zymosan injection (1 mg/cavity, i.p.). At 96-well plates, cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were exposed to 100  $\mu$ L of RPMI (with 10% of fetal bovine serum + 100 U/mL penicillin + 100  $\mu$ g/mL streptomycin). After 90 min, EEDd (3, 10, 30, 90  $\mu$ g/mL) or vehicle and 10  $\mu$ L of MTT (5 mg/mL) were added to each well and then incubated at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub> for 2 hr. Posteriorly, the supernatant was removed and 100  $\mu$ L of DMSO were added to each well and cells were again incubated at 25°C for 10 min. Absorbance was measured at 540 nm.<sup>[16]</sup> Viability was determined by the formula: viability (%) = (absorbance of treated cells – blank absorbance) / (control absorbance – blank absorbance) x 100. Data were presented as values of three independent experiments performed in triplicate.

### ***Statistics***

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard deviation) employing the software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). The results were statistically analyzed by variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls' or Tukey's or by two-way ANOVA followed by Bonferroni's tests. Differences were considered statistically different when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Only the dose of 300 mg/kg of EEDd significantly reduced the nociceptive behavior at phase 1 of the formalin-induced spontaneous nociception. All oral treatments with EEDd significantly decreased the nociception at phase 2 with follow inhibitions: 32 (30 mg/kg), 27 (100 mg/kg) and 67% (300 mg/kg). The morphine decreased the nociception on both phases (84 and 99%, respectively). All doses tested of EEDd significantly reduced the cold hyperalgesia (maximum inhibition of 98%) while morphine blocked the induction by formalin (Figure 1).

EEDd demonstrated anti-nociceptive effect on the acetic acid-induced abdominal contortion assay, decreasing the number of contortions in 22 (100 mg/kg) and 29% (300 mg/kg), while morphine was capable to decrease the number of contortions in 98% (Figure 2).

In CFA model, the daily administration of both doses of EEDd showed a significant reduction in mechanical hyperalgesia at all analyzed days. Reductions induced by EEDd to cold sensibility were detected in all analyzed days (76 and 82% at day 5; 77 and 71% at day 10; 64 and 72 % at day 15 and 75 and 50% at day 21 for doses of 100 and 300 mg/kg, respectively), as well with dexamethasone group (88; 74; 76 and 79% at days 5, 10, 15 and 21, respectively). Edema reduction by dexamethasone was observed at all analyzed days, with maximum reduction of 83% at the 21<sup>st</sup> day after oral administration of CFA. The group treated with the dose of 100 mg/kg presented maximum inhibition of 59%, while the group of dose 300 mg/kg demonstrated 62 and 48% at days 15 and 21 of treatment, respectively (Figure 3).

EEDd presented significant effects on the mechanical hyperalgesia at 4 h, but not 3 h, from zymosan-induced intra-articular inflammation. EEDd decreased the knee edema with inhibitions of 61 (100 mg/kg) and 47% (300 mg/kg) at 4 h and 71 (100 mg/kg) and 55% (300 mg/kg), at 6 hr after injection. All treatments significantly reduced the leucocyte migration, showing an inhibition of 35 and 57% at doses 100 and 300 mg/kg, respectively (Figure 4). Dexamethasone presented significant inhibitions on all evaluations.

EEDd (300 mg/kg) decreased the number of leucocytes migration in 37%, but the treatment with dose of 100 mg/kg did not show significative difference on zymosan-induced peritonitis. The treatment with 0.3, 3 and 30 mg/kg of BA reduced the leucocytes infiltration in 32, 54 and 72%, respectively, compared to the control group (Figure 5). Despite that, treatment with EEDd did not produced significative effects at nitrite concentration (data not shown). EEDd at concentrations of 3, 10, 30 and 90 µg/mL maintained leukocyte of 90.9, 81.1, 95.1 and 75.5%, respectively, showing that EEDd did not provoked cytotoxicity.

## DISCUSSION

Studies are relevant to obtain possible products that can combat pain and inflammatory processes. The concentration of BA found in EEDd is about 0.23%<sup>[7]</sup> and presents biological properties such as anti-inflammatory,<sup>[17,18]</sup> analgesic and antipyretic,<sup>[19]</sup> and antitumor activities.<sup>[20]</sup> BA could be the substance responsible for EEDd effects, since it showed efficacy against inflammation and pain in zymosan-induced peritonitis, probably by regulating cyclooxygenase-2 signaling and reducing the production of prostaglandin E<sub>2</sub>.<sup>[21,22]</sup> We did not test in other models since the literature showed BA has anti-inflammatory and analgesic effects.<sup>[21-23]</sup> The effective dose of EEDd to decrease the leukocyte infiltration at the zymosan-induced peritonitis was 300 mg/kg (Figure 5). According to the concentration, the effective dose of BA should be 0.69 mg/kg and the results showed that the doses from 0.3 to 30 mg/kg were effective in this model. In this way, we demonstrated that the analgesic activity of EEDd can be due to, in parts, the presence of BA in the extract.

The formalin assay is a model of nociception that has two phases, the first one is related to neurogenic pain since type C and A $\delta$  fibers are activated and the second phase related to inflammatory nociception in which inflammatory mediators release and stimulate the nociceptors.<sup>[9]</sup> Both phases are antagonized by opioids, while the NSAIDs compounds do not demonstrate great efficacy in phase 1.<sup>[24]</sup> The oral administration of EEDd, at all doses, substantially inhibited the inflammatory phase, in a dose-dependent manner and could interfere in peripheral and central pain mechanisms of formalin-induced nociception.

The administration of acetic acid at the peritoneal cavity promotes nociceptive pain and peripheral sensitization.<sup>[25]</sup> EEDd substantially decreased the number of abdominal contortions; confirming the studies performed by Oyebanji and collaborators<sup>[19]</sup> and Ali and coworkers<sup>[26]</sup> which correlated the anti-nociceptive effect of the acetic acid-induced abdominal contortions model in mice with BA and kaempferol. Both molecules are present in EEDd and their effects may be responsible for the folk use of *D. dentatus* to treat pain and inflammatory problems.<sup>[7]</sup>

The intraplantar injection of CFA induces an inflammatory response of long duration.<sup>[12]</sup> The CFA-induced polyarthritis is characterized by causing similar effects such as the rheumatoid arthritis.<sup>[27]</sup> In our study, the animals were evaluated for 21 days to investigate the anti-arthritic effects and the results demonstrated that the long term treatment with EEDd exhibited mechanical and thermal anti-hyperalgesic properties at the mechanical and thermal hyperalgesia, as well as anti-edematogenic effect. Ishikawa and coworkers<sup>[7]</sup> demonstrated that the treatment with doses of 100 or 300 mg/kg of EEDd inhibited the edema as well as the



mechanical hyperalgesia induced by carrageenan.<sup>[28]</sup> In addition, BA and quercetin (both present in EEDd)<sup>[7]</sup> showed therapeutic action on rheumatoid arthritis, decreasing the amount of inflammatory cytokines and modulating the immune response at the CFA-induced arthritis.<sup>[17, 29]</sup> The analgesic and anti-inflammatory effects of EEDd confirm the previous evidences of inflammatory stimulus by carrageenan, due to its anti-arthritic potential.

Zymosan induces the release of pro-inflammatory cytokines, chemokines, NO,<sup>[30]</sup> products from arachidonic acid, complement system, endothelin-1 and neutrophils infiltration.<sup>[31]</sup> Our data showed that EEDd inhibited the mechanical hyperalgesia, edema and the leukocytes infiltration at zymosan induced-inflamed knee. Guazelli and coauthors demonstrated that quercetin decreased pain, edema and leukocytes infiltration and the production and expression of inflammatory molecules at the zymosan-induced inflamed joint.<sup>[32]</sup> The *in vitro* treatment with EEDd did not compromised the cell viability in none of the tested concentrations, suggesting that the inhibitory effect at the leukocyte's migration was not due to toxic effects that cause cell death.

## CONCLUSION

The data presented here demonstrated the anti-inflammatory, anti-nociceptive and anti-arthritic potential of EEDd in mice. The mechanism of EEDd is probably related to the reduction of leukocyte migration, inhibiting pro-inflammatory cytokines. These properties make a highly interesting perspective for the treatment of chronic inflammatory diseases.

## CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest.

**Abbreviations Used:** EEDd: Extract in ethanol from the leaves of *Doliocarpus dentatus*. BA: Betulinic acid. CFA: Complete Freund adjuvant. MTT: 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide. PBS/EDTA: Phosphate-buffered saline that contained ethylenediaminetetraacetic. RPMI: Roswell Park Memorial Institute 1640 cell culture medium. DMSO: dimethylsulfoxide. SEM: Standard deviation. NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. NO: Nitric oxide. Dexam: Dexamethasone. p.o.: Oral route. i.p.: Intraperitoneally. s.c.: Subcutaneous.

## SUMMARY

We evaluated the anti-arthritic and anti-nociceptive potential of the ethanolic extract from the leaves of *Doliocarpus dentatus* in mouse model, based on the folk use of the species. Three doses were used and betulinic acid, a previous identified compound on the extract, was also assessed. The experiments showed that EEDd inhibited nociception, mechanical hyperalgesia,

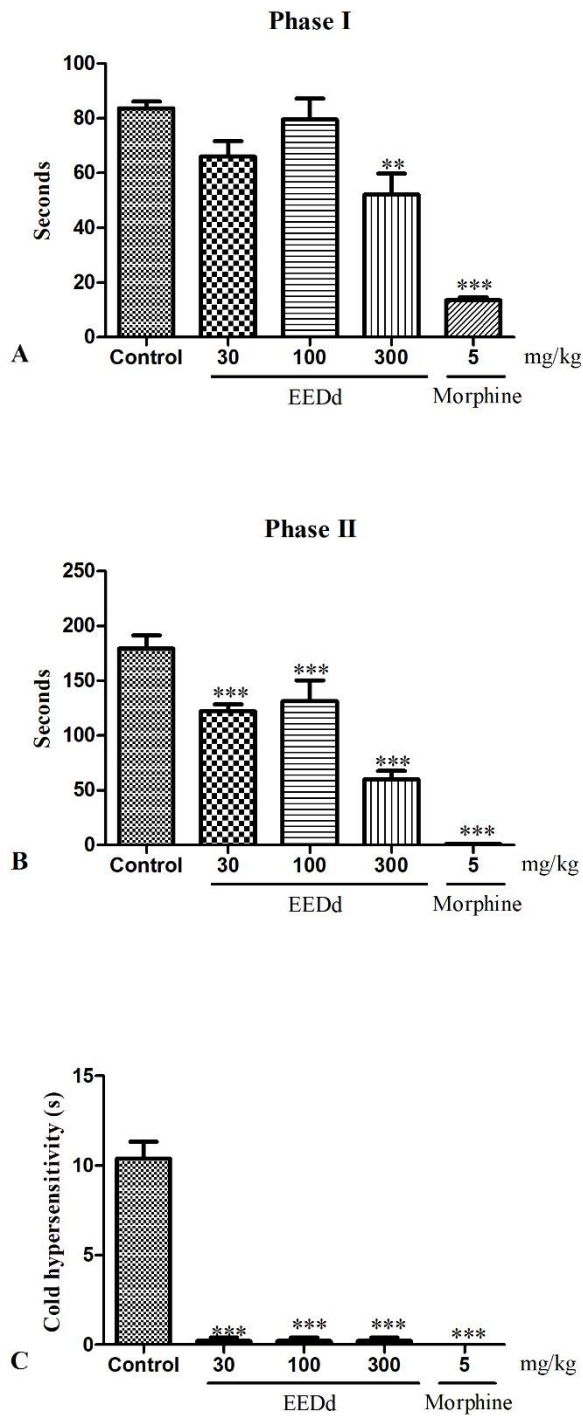
edema and cold sensitivity, prevented articular inflammation and did not induce leukocytes infiltration and cytotoxicity in mice.

## REFERENCES

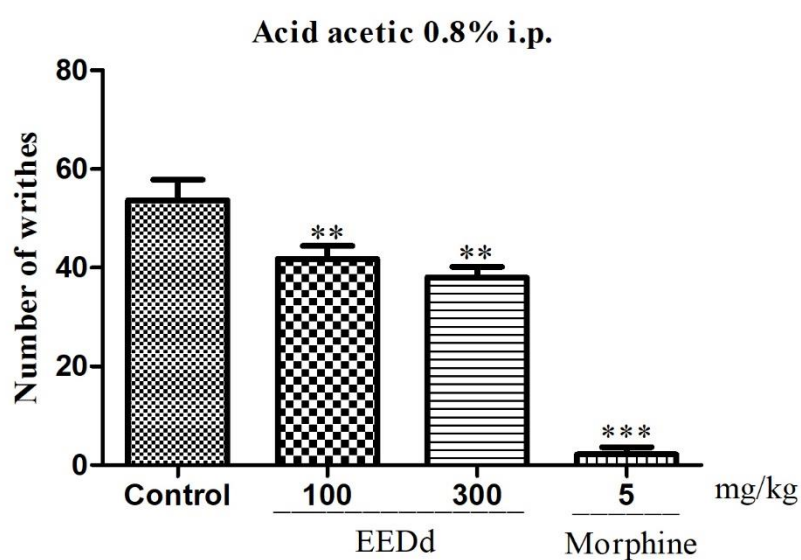
- [1] Michaelides A, Zis P. Depression, anxiety and acute pain: links and management challenges. *Postgraduate Medicine*, v. 131, n. 7, p. 438-444, 2019.
- [2] Gupta SC, Kunnumakkara AB, Aggarwal S, Aggarwal BB. Inflammation, a double-edge sword for cancer and other age-related diseases. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 2160, 2018.
- [3] Rodrigues VEG, Carvalho DD. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. *Cienc Agrotec*. 2001;25:102-23.
- [4] Aponte JC, Vaisberg AJ, Rojas R, Caviedes L, Lewis WH, Lamas G, et al. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. *J Nat Prod*. 2008;71:102-05.
- [5] Rodrigues VEG. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande, MG. 2007.
- [6] Sauvain M, Kunesch N, Poisson J, Gantier JC, Gayral P, Dedet JP. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother Res*. 1996;10:1-4.
- [7] Ishikawa RB, Leitão MM, Kassuya RM, Macorini LF, Moreira FMF, Cardoso CAL, et al. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus dentatus*. *J. Ethnopharmacol*. 2017;204:18-25.
- [8] Ishikawa RB, Vani JM, das Neves SC, Rabacow APM, Kassuya CAL, Croda J, et al. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. *J. Ethnopharmacol*. 2018;217:1-6.
- [9] Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;30:103-14.
- [10] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2000;87:149-58.
- [11] de Oliveira CM, Nonato FR, de Lima FO, Couto RD, David JP, David, JM, et al. Antinociceptive properties of bergenin. *J Nat Prod*. 2011;74:2062-68.
- [12] Kuraoka-Oliveira ÂM, Radai JAS, Leitão MM, Cardoso CAL, Silva-Filho SE, Kassuya CAL. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity in extract from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *J. Ethnopharmacol*. 2020;249:112418.

- [13] Yamada AN, Grespan R, Yamada ÁT, Silva EL, Silva-Filho, SE, Damião MJ, et al. Anti-inflammatory activity of *Ocimum americanum* L. essential oil in experimental model of zymosan-induced arthritis. *Am J Chinese Med.* 2013;41:913-26.
- [14] Silva-Filho SE, Wiirzler LAM, Cavalcante HAO, Uchida NS, de Souza Silva-Comar FM, Cardia GFE, et al. Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on *in vitro* and *in vivo* leukocytes behavior in acute inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1697-1704.
- [15] Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* 1981;212:56-8.
- [16] Silva-Filho SE, de Souza Silva-Comar FM, Wiirzler LAM, do Pinho RJ, Grespan R, Bersani-Amado CA, et al. Effect of camphor on the behavior of leukocytes *in vitro* and *in vivo* in acute inflammatory response. *Trop J Pharm Res.* 2014;13:2031-37.
- [17] Huimin D, Hui C, Guowei S, Shouyun X, Junyang P, Juncheng, W. Protective effect of betulinic acid on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats. *J Biochem Mol Toxic.* 2019;33:e22373.
- [18] Ekuadzi E, Biney RP, Benneh CK, Osei Amankwaa B, Jato J. Anti-inflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan-induced pleurisy model of lung inflammation in mice. *Phytother Res.* 2018;32:480-87.
- [19] Oyebanji BO, Saba AB, Oridupa AO. Studies on the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of betulinic acid derived from *Tetracera potatoria*. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014;11:30-3.
- [20] Nedopekina DA, Gubaidullin RR, Odinokov VN, Maximchik PV, Zhivotovsky B, Bel'skii YP, et al. Mitochondria-targeted betulinic and ursolic acid derivatives: synthesis and anticancer activity. *Med Chem Comm.* 2017;8:1934-45.
- [21] Wang J, Zhao Q. Betulinic acid inhibits cell proliferation, migration and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *J Cell Biochem.* 2019;120:2151-58.
- [22] Ou Z, Zhao J, Zhu L, Huang L, Ma Y, Ma C, et al. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomed Pharmacother.* 2019;118:109347.
- [23] Ríos JL, Máñez S. New pharmacological opportunities for betulinic acid. *Planta Med.* 2018;84:8-19.
- [24] Santos ARS, Vedana EMA, De Freitas GAG. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *J Inflamm Res.* 1998;47:302-07.

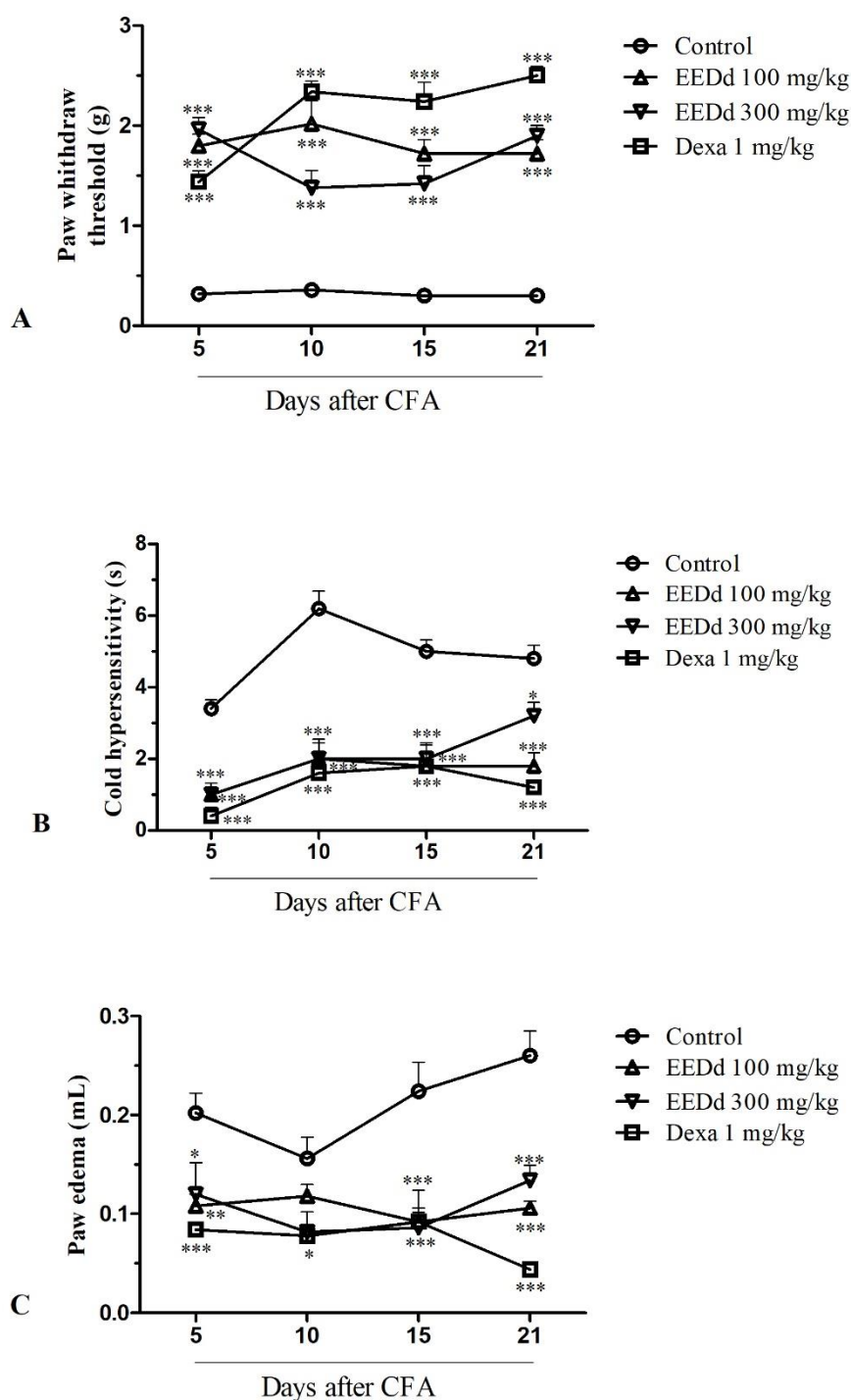
- [25] Duarte ID, Nakamura M, Ferreira SH. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Braz J Med Biol Res.* 1988;21:341-43.
- [26] Ali M, Rauf A, Ben Hadda T, Bawazeer S, Abu-Izneid T, Khan H, et al. Mechanisms underlying anti-hyperalgesic properties of Kaempferol-3,7-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside isolated from *Dryopteris cycadina*. *Curr Top Med Chem.* 2017;17:383-90.
- [27] Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;91:95-101.
- [28] Basu A, Das AS, Sharma M, Pathak MP, Chattopadhyay P, Biswas K, Mukhopadhyay R. STAT3 and NF- $\kappa$ B are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. *BB Reports.* 2017;12:54-61.
- [29] Saccol RDSP, da Silveira KL, Adefegha SA, Manzoni AG, da Silveira LL, Coelho APV, et al. Effect of quercetin on E-NTPDase/E-ADA activities and cytokine secretion of complete Freund adjuvant-induced arthritic rats. *Cell Biochem Funct.* 2019;37:474-85.
- [30] Guerrero AT, Cunha TM, Verri Jr WA, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Cunha FQ, et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. *Eur J Pharmacol.* 2012;674:51-7.
- [31] Hashimoto K, Oda Y, Nakagawa K, Ikeda T, Ohtani K, Akagi M. LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. *Eur J Histochem.* 2018;62.
- [32] Guazelli CF, Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Ruiz-Miyazawa KW, Vicentini FT, et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:175-84.



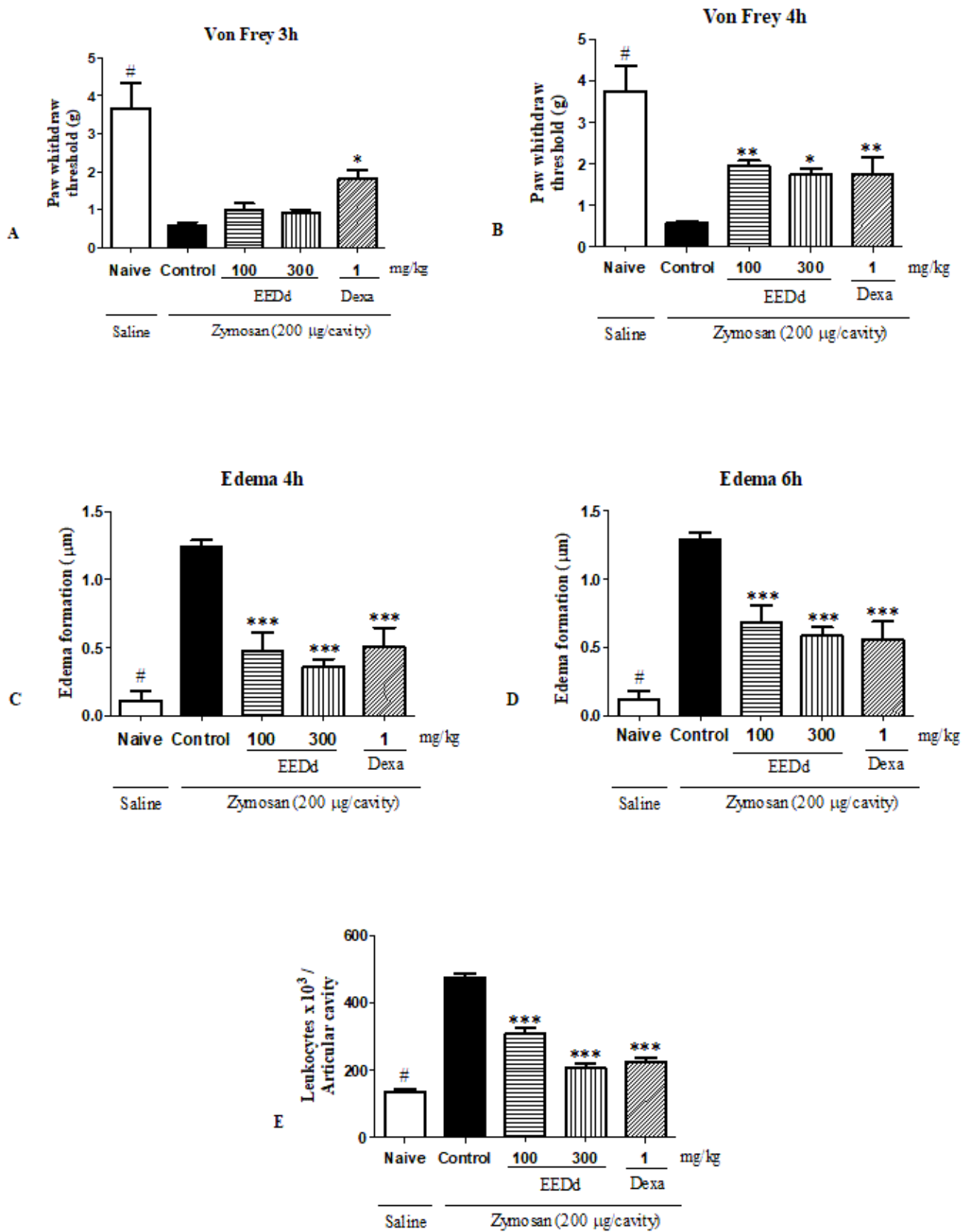
**Figure 1:** Effect of administration of EEDd (30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg, i.p.) on phase 1 (A), phase 2 (B) and cold hypersensitivity (C) induced by formalin injection in *Swiss* mice. Each bar represents mean  $\pm$  SEM of 6 animals.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  versus control (vehicle). One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.



**Figure 2:** Effect of administration of EEDd (100 and 300 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg, i.p.) on the acetic acid-induced abdominal writhing test in mice. Each bar represents mean  $\pm$  SEM of 6 animals \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus control (vehicle). One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.



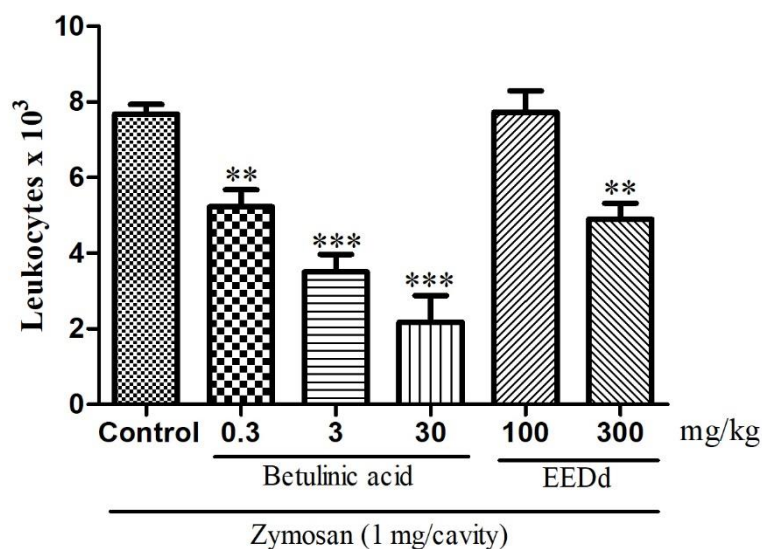
**Figure 3:** Effect of administration of EEDd (100 and 300 mg/kg, p.o.) and dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) (Dexa) on the mechanical von Frey analgesimeter test (A) and cold hyperalgesia (acetone test) (B) and edema (C) after 5, 10, 15 e 21 days from CFA paw injection in mice. Each bar represents mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  versus control (vehicle). Two-way ANOVA followed by the Bonferroni test.



**Figure 4:** Effect of EEDd (100 or 300 mg/kg, p.o.), vehicle or Dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) on mechanical hyperalgesia, edema and leukocyte recruitment in zymosan-induced articular



inflammation test in mice. Analysis of mechanical hyperalgesia in 3 and 4 h after injection (A and B), edema in 4 and 6 h after injection (C and D) and leukocyte recruitment 6 h after injection (E). Each bar represents mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to the control group, # indicates a statistically significant difference from the vehicle group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.



**Figure 5:** Effect of oral administration of betulinic acid (0.3, 3, 30 mg/kg) and EEDd (100 and 300 mg/kg) on leukocyte migration 6 h after zymosan injection (1 mg/cavity, i.p.) in Swiss mice. Each bar represents mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus control (vehicle). One-way ANOVA followed by the Tukey's test.

**Artigo 3: Avaliação do potencial de toxicidade da exposição aguda e subaguda do extrato etanólico das folhas de *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. em camundongos Swiss**

Avaliação do potencial de toxicidade da exposição aguda e subaguda ao extrato etanólico das folhas de *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. em camundongos Swiss

Lidiane Schultz Branquinho<sup>a</sup>, Maria Helena Verdan<sup>b</sup>, Elisangela dos Santos<sup>a</sup>, Luis Fernando Benitez Macorini<sup>a,f</sup>, Angela Midori Kuraoka-Oliveira<sup>f</sup>, Flávia Barbieri Bacha<sup>f</sup>, Cláudia Andrea Lima Cardoso<sup>c</sup>, Arielle Cristina Arena<sup>d</sup>, Saulo Euclides Silva-Filho<sup>e</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya<sup>a</sup>

*a School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

*b Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Grande Dourados – Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

*c Center of Studies in Natural Resources, State University of Mato Grosso Do Sul - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

*d Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP – Paulista State University - Botucatu, São Paulo State, Brazil*

*e Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

*f University Center of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

Author for correspondence: Candida Kassuya – candida2005@gmail.com

Address: School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rodovia Dourados-Itahum, km 12, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326.

## Resumo

*Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae) é uma espécie utilizada tradicionalmente na medicina popular para o tratamento de inflamação e dor; entretanto; estudos que avaliam seus efeitos adversos, bem como, seus efeitos sobre ansiedade e depressão são escassos na literatura. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil toxicológico do extrato etanólico de folhas obtidas de *Doliocarpus dentatus* (EEDd), bem como seus efeitos sobre modelos de ansiedade e depressão em camundongos. No teste de toxicidade aguda, camundongos machos e fêmeas foram expostos a doses de 500, 1000 ou 2000 mg/kg de EEDd em dose única (via oral) e parâmetros comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos foram avaliados. Para o teste de toxicidade subaguda, os animais foram expostos diariamente por 28 dias com 75, 150 ou 300 mg/kg de EEDd, via oral, e ao final do experimento, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos foram analisados. Durante o teste de toxicidade subaguda, os testes de suspensão da cauda, labirinto em cruz elevado e teste de esconder esferas foram realizados nos dias 4, 14, 21 e 28 após a administração do EEDd. No teste de toxicidade aguda, a exposição a dose única de 2000 mg/kg de EEDd não induziu morte, estimando a dose letal aguda mediana (DL50) em mais de 2000 mg/kg. Após a administração repetida de EEDd, foram observados leves sinais clínicos de toxicidade nos animais e alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados. No entanto parâmetros hematológicos e histopatológicos não revelaram alterações. Além disso, a exposição ao EEDd não provocou aumento no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, não induziu uma diminuição no tempo gasto no braço aberto durante as o teste do labirinto em cruz elevado e não aumentou o número de esferas escondidas. Esse estudo demonstra que o EEDd demonstrou baixa toxicidade em camundongos após exposição aguda e prolongada. Considerando os protocolos de toxicidade aguda e subaguda, outros estudos de toxicidade crônica em animais devem ser realizados a fim de caracterizar o potencial de danos do extrato etanólico de *D. dentatus*,

**Palavras-chave:** *Doliocarpus dentatus*; parâmetros bioquímicos; histologia; comportamento; camundongo

## 1. Introdução

*Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. (Dilleniaceae), espécie encontrada na região da Amazônia e Cerrado brasileiro, é utilizada popularmente no tratamento de dor e edema inflamatório, cistite e leishmaniose (Rodrigues, 2007; Jagessar; Persid, 2014), hemorroidas (Bieski et al., 2015), bem como diurético (Ribeiro et al., 2017) e para aliviar os sintomas da malária (Ramírez e Blair, 2017).

Estudos *in vitro* mostram que *D. dentatus* apresenta atividade contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (Sauvain et al., 1996), além de atividades contra outros microrganismos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* (Jagessar; Persid, 2014) e *Mycobacterium tuberculosis*. Esta planta também demonstrou propriedades citotóxicas em células leucêmicas da linhagem K562 (Aponte et al., 2007).

A fim de verificar cientificamente as propriedades biológicas descritas empiricamente, um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou atividade antinociceptiva do extrato aquoso das folhas de *D. dentatus* (Branquinho et al., 2020). Propriedades antimicobacteriana e anti-inflamatória nos modelos de edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina foram relatados do extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* (Ishkawa et al., 2017).

Além da comprovação terapêutica de um produto obtido a partir de plantas, outro aspecto a ser considerado é seu perfil toxicológico. Pesquisas toxicológicas agregam valor à etnofarmacologia, fornecendo informações sobre possíveis riscos à saúde e evitando a ocorrência efeitos indesejáveis, que são considerados o problema em relação as drogas sintéticas (Mirza; Panchal, 2019).

Diante do exposto, nota-se que as informações científicas sobre os estudos de toxicidade de *Doliocarpus dentatus in vivo* são escassas, e até onde sabemos, as pesquisas sobre o perfil de segurança do EEDd são limitadas. Considerando o uso popular e o potencial farmacológico de *D. dentatus*, o presente estudo objetiva investigar os possíveis efeitos de toxicidade aguda e subaguda em camundongos de ambos os sexos expostos via oral ao EEDd, bem como seus efeitos sobre modelos de ansiedade e depressão.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Material vegetal e preparação do extrato

A coleta do material vegetal, folhas de *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl., foi realizada no Campus da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul em Campo Grande, Brasil (20° 29' 59.6" S, 54° 36' 46.1" O). A espécie foi identificada pelo Dr. Arnildo Pott e uma exsicata (#49860) foi depositada no herbário da UFMS (CGMS).

As folhas foram secas a 40 °C, trituradas e extraídas com etanol (95%) por maceração a frio. Foram realizadas sete extrações consecutivas, sendo que cada uma delas por um período de 24 horas. Na sequência, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o extrato etanólico total obtido.

## 2.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas, com peso médio de entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFGD sob autorização nº 39/2017. Sete dias antes do início de cada experimento, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C) e 55% de umidade relativa em ar condicionado com ciclo claro-escuro de 12 h e receberam ração comercial e água filtrada *ad libitum*.

## 2.3 Toxicidade oral aguda

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado de acordo com a diretriz 425 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Camundongos *Swiss* de ambos os sexos foram mantidos em jejum por 12 h. Após esse período, um primeiro animal foi exposto a 500 mg/kg de EEDd oralmente e foi monitorado quanto a sintomas de toxicidade e mortalidade nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 e 48 h. Posteriormente, como não houve morte, outro animal recebeu EEDd 1000 mg/kg. Após 48 h, um terceiro animal foi exposto a uma dose de 2000 mg/kg de EEDd. Como nenhum óbito foi observado nas doses anteriores, um grupo adicional de 4 animais receberam EEDd 2000 mg/kg ou solução salina 0,9% (veículo) nas mesmas condições experimentais (OECD, 2008a).

Após a exposição, os animais foram monitorados periodicamente nas primeiras 24 h após a administração do EEDd e, posteriormente, uma vez ao dia durante 14 dias. Nesta observação, foi verificada a presença ou ausência dos parâmetros da triagem hipocrática, tais como estado de consciência, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular,

atividades no sistema nervoso central e autônomo e reflexos (Malone; Robichaud, 1962; OECD, 2008a). Ao final do período de observação, os animais foram submetidos à eutanásia e foi realizada coleta de sangue para as análises hematológicas e bioquímicas do soro. Os órgãos coração, pulmão, baço, rim e fígado foram retirados para avaliação macroscópica e histopatológica.

#### **2.4 Toxicidade oral subaguda**

O procedimento foi realizado de acordo com a diretriz 207 da OECD (OECD, 2008b). No teste de toxicidade subaguda, 20 camundongos *Swiss* machos e 20 fêmeas foram distribuídos em quatro grupos de 5 animais/grupo/sexo. O grupo 1 (controle) recebeu solução salina 0.9% (veículo), enquanto os grupos 2, 3 e 4 receberam por via oral 75, 150 ou 300 mg/kg de EEDd, respectivamente.

Durante 28 dias, os animais receberam EEDd diariamente por via oral e foram observados uma vez por dia para detectar sinais de morbidade e mortalidade. O consumo alimentar e o peso corporal foram determinados semanalmente para ajustar o volume do extrato. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg, i.p.) e amostras de sangue foram coletadas através da técnica de punção cardíaca, uma vez que é um procedimento conveniente para obtenção de grandes quantidades de sangue em camundongos. Os órgãos vitais foram retirados para avaliações morfológicas e histopatológicas e os pesos relativos calculados.

#### **2.5 Análises hematológicas e bioquímicas**

A partir do sangue total com anticoagulante, os parâmetros hematológicos, como contagem de hemácias e leucócitos, dosagem de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem de plaquetas foram determinados com o auxílio de um analisador de hematologia (KX-21N Sysmex).

Após a análise hematológica, o soro foi separado e foram avaliados os parâmetros bioquímicos séricos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina e proteína total através de um analisador Cobas C111, utilizando kit comercial (Roche Diagnóstica).

## **2.6 Análise histopatológica**

Os animais foram submetidos a necropsia macroscópica e o coração, pulmão, baço, rim e fígado coletados. Os tecidos foram preservados em formalina 10%, desidratados em etanol gradual (50–100%) e posteriormente incluídos em parafina e seccionados a 5  $\mu$ m. Os cortes foram corados hematoxilina e eosina para exame histopatológico subsequente.

## **2.7 Testes comportamentais**

O comportamento depressivo foi investigado usando o teste de suspensão pela cauda, enquanto os sintomas de ansiedade foram avaliados usando o labirinto em cruz elevado e o teste de esconder esferas com pequenas modificações. Os experimentos foram realizados uma vez por semana durante o teste de toxicidade oral subaguda (totalizando 4 análises) e todos os animais de cada grupo de ambos os sexos foram avaliados.

### **2.7.1 Teste de suspensão pela cauda**

Os camundongos foram individualmente suspensos aproximadamente 1 cm da ponta da cauda com fita adesiva e a distância entre a ponta da cauda e o chão era de aproximadamente 30 cm. O tempo de imobilidade (quando o animal para de fazer qualquer movimento, ficando pendurado passivamente) foi registrado por um período de 6 min (Steru et al., 1985).

### **2.7.2 Labirinto em cruz elevado**

O teste do labirinto em cruz elevado foi baseado no protocolo proposto por Lister (1987). Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto e observados durante 5 min e foram registrados o número de entradas e o tempo em que o animal permaneceu nos braços abertos e fechados. Uma entrada era pontuada quando o animal colocava as quatro patas em um dos braços do labirinto. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos foi expresso como uma porcentagem do número total de entradas de braço.

### **2.7.3 Teste de esconder esferas**



Os camundongos foram introduzidos individualmente durante 30 min em caixas de acrílico transparente com maravalha de 5 cm de profundidade contendo 20 esferas de vidro (15 mm de diâmetro) distribuídas. A quantidade de esferas escondidas pelos animais durante o teste foi contada. A esfera foi considerada escondida quando pelo menos dois terços estava coberto por maravalha (Broekkamp et al., 1986).

## **2.8 Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados experimentais foram analisados usando teste t de Student para duas amostras independentes, análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Tukey ou teste de Bonferroni, conforme apropriado. As análises foram realizadas usando o software estatístico GraphPad InStat ou GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **3. Resultados**

No teste de toxicidade aguda, a exposição com a dose única de 2000 mg/kg de EEDd não induziu morte ou sinais clínicos de toxicidade nos camundongos machos e fêmeas durante o período de estudo. Além disso, o EEDd não provocou alterações de pele, olhos, lacrimação, diarreia ou padrões de comportamento dos animais. A tabela 1 mostra o efeito do EEDd 2000 mg/kg sob o peso corporal e o peso absoluto e relativo do coração, pulmão, baço, rim e fígado dos camundongos machos e fêmeas. Não foram observadas diferenças significativas em ambos os sexos quando comparados com o grupo controle.

Os parâmetros hematológicos apresentados na Tabela 2 mostra que não houveram diferenças significativas entre os grupos de animais machos e fêmeas expostos a dose única de EEDd e o grupo controle ( $p > 0,05$ ). A análise bioquímica revelou um aumento na concentração da enzima AST nos camundongos machos expostos a 2000 mg/kg de EEDd (Tabela 2). No entanto, a necropsia não revelou sinais patológicos.

Na avaliação da toxicidade subaguda não foram observadas mortes ou quaisquer sinais clínicos de toxicidade nos animais. O consumo de ração e água dos camundongos machos e fêmeas expostos ao EEDd 75, 150 e 300 mg/kg não demonstrou diferenças significativas quando comparados com o grupo controle (resultados não mostrados).

A análise do peso corporal não mostrou diferenças entre os grupos exposto e o controle durante os 28 dias de exposição, tanto nos camundongos machos, quanto fêmeas (Figuras 1 e 2). Nenhuma mudança significativa no peso relativo e absoluto do coração, pulmão, baço, rim e fígado foi observada, exceto para o peso absoluto do rim dos machos, que foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) nos animais expostos a 300 mg/kg de EEDd (Tabela 3 e 4).

As tabelas 5 e 6 mostram os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos machos e fêmeas expostos ao EEDd, respectivamente. A análise estatística não demonstrou nenhuma diferença significativa na avaliação hematológica. A avaliação bioquímica demonstrou um aumento na concentração sérica da enzima AST nos camundongos machos expostos a dose de 300 mg/kg ( $p < 0,01$ ) e de ureia nos machos e 150 mg/kg ( $p < 0,001$ ) e uma leve diminuição nos camundongos expostos a 75 mg/kg ( $p < 0,05$ ) de EEDd. No entanto, os exames histopatológicos revelaram histologia normal nos animais machos e fêmeas em todas as doses testadas.

O resultado das análises comportamentais realizadas com os animais machos e fêmeas durante a exposição por 28 dias com EEDd está representado na Figura 3. As doses de 75, 150 e 300 mg/kg não provocaram aumento no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, com exceção da 3ª semana, quando os animais expostos a dose de 300 mg/kg de EEDd tiveram o tempo de imobilidade reduzido ( $p < 0,001$ ) nos camundongos fêmeas em comparação com aqueles expostos ao veículo (Figura 3A e B). Por fim, o EEDd não induziu uma diminuição no tempo gasto no braço aberto durante as o teste do labirinto em cruz elevado (Figuras 3C e D) e não aumentou o número de esferas escondidas nas 4 análises realizada (Figuras 3E e F).

#### **4. Discussão**

Estudos toxicológicos são necessários para garantir a segurança de uma preparação para uso clínico e determinar potenciais efeitos colaterais e fornecer informações para a escolha de doses seguras para consumo humano (Yazdi et al., 2019). Como não existe relato na literatura sobre a segurança do extrato etanólico de *D. dentatus in vivo*, o presente estudo foi realizado a fim de testar o potencial de toxicidade oral aguda e subaguda em camundongos machos e fêmeas.

A avaliação da toxicidade aguda mostrou que o EEDd a dose de 2000 mg/kg não induziu mortalidade ou sintomas de toxicidade em camundongos de ambos os sexos ao longo do

período de observação. Não houveram diferença significativa no peso corporal, peso absoluto e relativo dos órgãos, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Dessa forma, a dose letal aguda mediana (DL50) do extrato foi estimada em mais de 2000 mg/kg. O estudo de Ishikawa et al. (2017) relatou que os camundongos machos expostos via oral com EEDd (10, 100 e 1000 mg/kg) também não apresentaram diferenças significativas nos valores de peso inicial e final e peso do coração, pulmão, baço, fígado e rim em comparação com o grupo controle. Além disso, os ensaios toxicogenéticos realizados no estudo de Ishikawa et al. (2017) demonstraram que a exposição ao EEDd não induziu danos ao DNA nos testes de cometa e micronúcleo e não modificou a fagocitose esplênica, o que fornece evidências consideráveis que a exposição oral aguda ao EEDd é segura em camundongos.

Os achados no estudo de toxicidade subaguda mostraram que a exposição oral durante 28 dias com EEDd nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg não provocou morbidade, mortalidade ou alterações significativas no comportamento geral dos camundongos machos e fêmeas. O consumo de ração e água, bem como o peso corporal e dos principais órgãos dos animais em experimento são importantes para a avaliação dos efeitos potencialmente tóxicos de produtos fitoterápicos (Bailey et al., 2004; Reduan et al., 2020). No presente estudo, a exposição ao EEDd não afetou negativamente o peso corporal, nem a ingestão de ração e água dos demais animais. No entanto, foi observado uma diminuição no peso absoluto do rim nos camundongos machos expostos a 300 mg/kg de EEDd. O peso relativo do rim, bem como os parâmetros bioquímicos relacionados com a função renal (AST e ureia) foram aumentados nos animais expostos a esta dosagem. Um estudo anterior sobre a administração de EEDd (100 e 1000 mg/kg) no período gestacional, demonstrou que a exposição oral não provocou diferenças significativas no peso inicial e final dos animais e nos pesos absoluto e relativo dos órgãos reprodutivos femininos (Ishikawa et al., 2018).

A análise hematológica fornece dados relevantes e deve ser incluída na avaliação de efeitos tóxicos de plantas medicinais. O transporte de drogas e xenobióticos pelo corpo se dá através do sangue e na circulação sanguínea, qualquer agente tóxico pode danificar células maduras ou os precursores dessas células na medula óssea direta ou indiretamente, reduzindo a quantidade de células no sistema hematopoiético (Reduan et al., 2020). Nenhuma diferença foi observada sobre os valores de hemácias, leucócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM relacionados a exposição subaguda ao EEDd nos camundongos machos e fêmeas, descartando efeitos prejudiciais no sistema hematopoiético e sugerindo que o EEDd não induziu toxicidade sistêmica. Esses achados corroboram com os de Ishikawa et al. (2018),

que relataram que EEDd não afeta o desenvolvimento embriofetal e não é teratogênico em camundongos fêmeas prenhas.

A nível sistêmico, o fígado e o rim são os órgãos mais expostos a substâncias tóxicas, atuando principalmente na regulação do metabolismo e na filtração de toxinas do sangue (Reduan et al., 2020). Drogas potencialmente tóxicas alteram a concentração sérica das enzimas AST e ALT, as quais são utilizadas como indicadores da função hepática (De Oliveira et al., 2020). Em relação ao dano hepatocelular, a enzima ALT encontrada no citoplasma do hepatócito é a forma predominante no soro na em lesão hepática leve, enquanto lesões graves promovem a liberação da enzima mitocondrial, AST, elevando a relação AST/ALT. Tal diferença pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico de doenças hepáticas (Motta, 2003). A variação relacionada ao aumento de AST observada nos camundongos machos após a exposição em dose única de 2000 mg/kg, bem como após a exposição diária de 300 mg/kg de EEDd pode estar relacionado ao dano hepatocelular. O exame histopatológico, realizado a fim de confirmar o diagnóstico de toxicidade sistêmica não revelou lesões hepáticas. Dessa forma, estudos de toxicidade crônica devem ser realizados a fim de caracterizar o potencial de danos ao fígado pelo EEDd.

A função renal é representada pelos biomarcadores ureia, creatinina e proteína total (Korim et al., 2019). A concentração de ureia dos camundongos machos expostos ao EEDd (75 e 150 mg/kg) apresentou valores significativos em comparação com o grupo controle. No entanto, os níveis de ureia devem ser analisados concomitantemente com os níveis de creatinina, sendo este um indicador específico de lesão renal (Traynor et al., 2006; Zhang et al., 2017). Dessa forma, os níveis séricos de creatinina e proteína total não revelaram qualquer alteração, mesmo com a dose mais elevada (300 mg/kg) de EEDd em comparação com o grupo controle em camundongos machos e fêmeas. No presente estudo, a histopatologia do rim não revelou nenhuma alteração. Coletivamente, os achados sugerem que a administração diária do EEDd durante 28 dias nas doses testadas produz baixa toxicidade.

Além do potencial tóxico, foi investigada a capacidade do EEDd em desenvolver depressão e ansiedade. A triagem de drogas depressivas pode ser feita através do teste de suspensão pela cauda. Nesse modelo, os animais são suspensos pelo rabo em uma situação inelutável, onde tentam escapar através uma atividade vigorosa e quando se tornam imóveis demonstram um sintoma comportamental de desespero. As substâncias que aumentam o tempo de imobilidade dos animais são conhecidas por apresentar efeitos depressivos em humanos (Dougnon; Ito, 2020). A administração diária de EEDd (75, 150 e 300 mg/kg) não aumentou o tempo de imobilidade dos animais, portanto não foi detectada atividade

depressiva. O teste do labirinto em cruz elevado e o teste de esconder esferas foram executados para avaliar o comportamento ansioso relacionado à depressão, os quais são baseados na exposição dos animais a uma condição estressante. O teste do labirinto em cruz elevado avalia o comportamento de aversão dos camundongos ao entrar em uma arena aberta, já o teste de esconder esferas é fundamentado na tendência do animal a enterrar bolinhas de vidro, tais comportamentos são relacionados à ansiedade (De Almeida et al., 2012; Zhang et al., 2020). Nossos resultados mostraram que a exposição diária durante 28 dias ao EEDd não induziu comportamentos de ansiedade nos camundongos machos e fêmeas.

## 5. Conclusão

Este estudo demonstrou que a administração aguda de 2000 mg/kg do EEDd não induziu mortalidade, indicando que o DL50 é superior a esta dose. Não foram observadas alterações fisiológicas nos parâmetros hematológicos e histopatológicos no estudo de toxicidade aguda. Na exposição subaguda, a administração oral de EEDd nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg durante 28 dias não provocou alterações nos parâmetros hematológicos e alterações microscópicas nos principais órgãos. Nos parâmetros bioquímicos foram observados sinais leves de toxicidade. Além disso, a exposição subaguda ao EEDd não induziu sintomas de depressão ou ansiedade. Considerando os protocolos de toxicidade aguda e subaguda, a exposição via oral à *Doliocarpus dentatus* demonstrou baixa toxicidade em camundongos. Estudos adicionais devem ser realizados para que haja evidências sobre os aspectos de segurança a longo prazo do EEDd.

## REFERÊNCIAS

- APONTE, J. C. et al. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 102-105, 2008.
- BAILEY, S. A. et al. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. **Toxicologic pathology**, v. 32, n. 4, p. 448-466, 2004.
- BIESKI, I. G. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of valley of Juruena region, legal amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 2015.
- BRANQUINHO, L. S. et al. Aqueous extract from leaves of *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl. relieves pain without genotoxicity activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 266, p. 113440, 2020.
- BROEKKAMP, C. L. et al. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 126(3), p. 223–229, 1986.
- DE ALMEIDA, A. A. C. et al. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- DE OLIVEIRA, N. A. et al. Acute and subacute (28 days) toxicity of green coffee oil enriched with diterpenes cafestol and kahweol in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 110, p. 104517, 2020.
- DOUGNON, G.; ITO, M. Inhalation administration of the bicyclic ethers 1, 8-And 1, 4-cineole prevent anxiety and depressive-like behaviours in mice. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1884, 2020.
- ISHIKAWA, R. B. et al. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus dentatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 18-25, 2017.
- ISHIKAWA, R. B. et al. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 1-6, 2018.
- JAGESSAR, R. C.; PERSID, R. Antimicrobial activity of uncombined and combined extracts of *Doliocarpus dentatus* and *Montricardia arborescens*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 1, p. 286, 2014.
- KORIEEM, K. M. M. et al. Acute and subacute toxicity of *Ammi visnaga* on rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 26-35, 2019.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92 (2), p. 180–185, 1987.
- MALONE, M. H.; ROBICHAUD. R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*. v. 25, p. 320-331, 1962.

MIRZA, A. C.; PANCHAL, S. S. Safety evaluation of syringic acid: subacute oral toxicity studies in Wistar rats. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02129, 2019.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica Para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Médica Missau, 419 p., 2003.

OECDa, Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Publishing, 2008.

OECDb, Test No. 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Publishing, 2008.

RAMÍREZ, O.; BLAIR, S. Ethnobotany of Medicinal Plants Used to Treat Malaria by Traditional Healers from Ten Indigenous Colombian Communities Located in Vaupes Medio. **Biodiversity International Journal**, v. 1, n. 4, p. 151-167, 2017.

REDUAN, F. H. et al. Acute and subacute dermal toxicity of ethanolic extract of *Melastoma malabathricum* leaves in Sprague-Dawley rats. **Toxicological Research**, p. 1-8, 2020.

RIBEIRO, R. V. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

RODRIGUES, V. E. G. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande, MG. 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SAUVAIN, M. et al. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 1996.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p.367–370, 1985.

TRAYNOR, J. et al. How to measure renal function in clinical practice. **Bmj**, v. 333, n. 7571, p. 733-737, 2006.

YAZDI, J. A. Acute and sub-acute toxicity evaluation of the root extract of *Rheum turkestanicum* Janisch. **Drug and chemical toxicology**, v. 43, n. 6, p. 609-615, 2019.

ZHANG, G-M. et al. Limiting the testing of urea: Urea along with every plasma creatinine test?. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 31, n. 5, p. e22103, 2017.

ZHANG, K. et al. Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in perimenopausal mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, p. 112318, 2020.

**Tabela 1.** Peso corporal e peso absoluto e relativo dos órgãos dos animais machos e fêmeas após administração oral aguda (2000 mg/kg) EEDd.

<b>Órgão</b>	<b>Controle macho</b>	<b>2000 mg/kg macho</b>	<b>Controle fêmea</b>	<b>2000 mg/kg fêmea</b>
Peso inicial	25,22 ± 0,39	26,23 ± 1,61	19,37 ± 0,66	19,12 ± 0,51
Peso final	30,77 ± 0,87	28,9 ± 0,85	27,75 ± 1,3	26,9 ± 0,93
Coração	0,15 ± 0,009	0,15 ± 0,002	0,11 ± 0,004	0,12 ± 0,01
Coração (g/100g)	0,48 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,03
Pulmão	0,17 ± 0,008	0,17 ± 0,008	0,15 ± 0,008	0,15 ± 0,01
Pulmão (g/100g)	0,56 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,56 ± 0,05
Baço	0,10 ± 0,009	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,006	0,13 ± 0,01
Baço (g/100g)	0,35 ± 0,03	0,44 ± 0,07	0,46 ± 0,03	0,50 ± 0,06
Rim	0,25 ± 0,006	0,25 ± 0,008	0,14 ± 0,008	0,19 ± 0,009
Rim (g/100g)	0,83 ± 0,03	0,88 ± 0,04	0,63 ± 0,01	0,70 ± 0,16
Fígado	1,60 ± 0,19	1,28 ± 0,10	1,07 ± 0,04	1,28 ± 0,17
Fígado (g/100g)	5,25 ± 0,68	4,79 ± 0,28	4,62 ± 0,19	4,75 ± 0,57

Valores expressos como média ± EPM (n = 4). Teste t de Student.

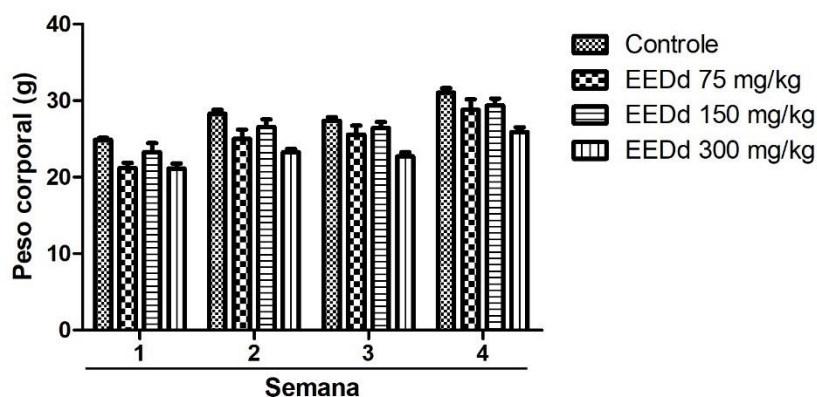
**Tabela 2.** Efeitos da administração oral aguda (2000 mg/kg) de EEDd nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle macho</b>	<b>2000 mg/kg macho</b>	<b>Controle fêmea</b>	<b>2000 mg/kg fêmea</b>
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	5,82 ± 0,67	3,37 ± 0,86	4,25 ± 1,09	3,0 ± 0,61
Hemácias (10 <sup>6</sup> /μL)	8,07 ± 0,11	8,45 ± 0,36	8,01 ± 0,08	8,33 ± 0,31
Hemoglobina (g/dL)	12,9 ± 0,12	13,47 ± 0,44	13,15 ± 0,08	13,63 ± 0,39
Hematócrito (%)	43,15 ± 0,82	45,15 ± 1,76	42,72 ± 0,48	44,4 ± 1,73
VCM (fL)	53,45 ± 0,33	53,42 ± 0,28	53,37 ± 0,37	53,23 ± 0,12
HCM (pg)	16 ± 0,10	15,95 ± 0,15	16,4 ± 0,23	16,36 ± 0,14
CHCM (g/dL)	29,92 ± 0,37	29,85 ± 0,18	30,75 ± 0,48	30,73 ± 0,31
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	1079 ± 71,93	1272 ± 83,76	960,75 ± 11,30	1164,3 ± 73,95
<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>Controle macho</b>	<b>2000 mg/kg macho</b>	<b>Controle fêmea</b>	<b>2000 mg/kg fêmea</b>
AST (U/L)	69,4 ± 8,95	114,82 ± 20,71*	132,65 ± 21,65	103,55 ± 17,42
ALT (U/L)	34,1 ± 1,63	30,47 ± 1,55	30,85 ± 1,22	26,72 ± 1,99
Ureia (mg/dL)	53,4 ± 1,24	56,37 ± 2,94	53,85 ± 4,35	56,37 ± 4,1

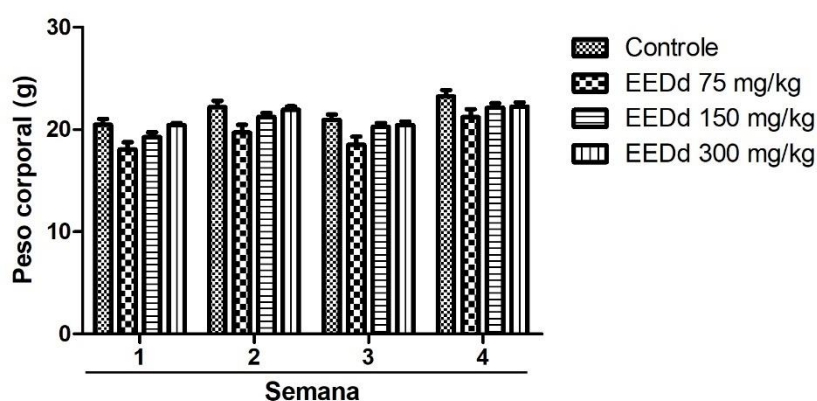


Creatinina (mg/dL)	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,2 ± 0,00
Proteína total (g/dL)	44,27 ± 2,43	39,82 ± 1,48	41,02 ± 1,52	40,75 ± 1,87

Valores expressos como média ± EPM (n = 4). VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase). \* p < 0,05 quando comparado com o grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.



**Figura 1.** Efeito da administração oral de EEDd no peso corporal semanal de camundongos *Swiss* machos durante os 28 dias do teste de toxicidade subaguda. As barras representam a média ± EPM (n = 5). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.



**Figura 2.** Efeito da administração oral de EEDd no peso corporal semanal de camundongos *Swiss* fêmeas durante os 28 dias do teste de toxicidade subaguda. As barras representam a média ± EPM (n = 5). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

**Tabela 3.** Efeitos da administração oral de 75, 150 e 300 mg/kg/dia de EEDd (28 dias) nos pesos absolutos e relativos dos órgãos dos camundongos machos.

<b>Órgão</b>	<b>Controle</b>	<b>75 mg/kg</b>	<b>150 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>
Coração	0,14 ± 0,005	0,13 ± 0,006	0,14 ± 0,007	0,12 ± 0,005
Coração (g/100g)	0,47 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,01
Pulmão	0,17 ± 0,006	0,15 ± 0,005	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,004
Pulmão (g/100g)	0,55 ± 0,01	0,56 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,57 ± 0,01
Baço	0,11 ± 0,005	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,008	0,08 ± 0,007
Baço (g/100g)	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,02
Rim	0,24 ± 0,006	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,19 ± 0,004**
Rim (g/100g)	0,80 ± 0,02	0,80 ± 0,03	0,81 ± 0,04	0,76 ± 0,02
Fígado	1,58 ± 0,11	1,25 ± 0,08	1,26 ± 0,11	1,19 ± 0,07
Fígado (g/100g)	5,11 ± 0,39	4,35 ± 0,20	4,33 ± 0,41	4,59 ± 0,21

Valores expressos como média ± EPM (n = 5). \*\* p < 0,01 quando comparado com o grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

**Tabela 4.** Efeitos da administração oral de 75, 150 e 300 mg/kg/dia de EEDd (28 dias) nos pesos absolutos e relativos dos órgãos dos camundongos fêmeas.

<b>Órgão</b>	<b>Controle</b>	<b>75 mg/kg</b>	<b>150 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>
Coração	0,11 ± 0,002	0,10 ± 0,005	0,11 ± 0,003	0,11 ± 0,003
Coração (g/100g)	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,01
Pulmão	0,15 ± 0,006	0,15 ± 0,009	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02
Pulmão (g/100g)	0,65 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,70 ± 0,005	0,71 ± 0,008
Baço	0,11 ± 0,003	0,09 ± 0,009	0,10 ± 0,008	0,10 ± 0,004
Baço (g/100g)	0,47 ± 0,01	0,42 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,02
Rim	0,15 ± 0,007	0,12 ± 0,006	0,14 ± 0,003	0,14 ± 0,006
Rim (g/100g)	0,66 ± 0,02	0,60 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,66 ± 0,02
Fígado	1,05 ± 0,03	0,78 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,91 ± 0,02
Fígado (g/100g)	4,55 ± 0,11	3,73 ± 0,38	4,28 ± 0,25	4,10 ± 0,10

Valores expressos como média ± EPM (n = 5). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

**Tabela 5.** Efeitos da administração oral de 75, 150 e 300 mg/kg/dia de EEDd (28 dias) nos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos machos.

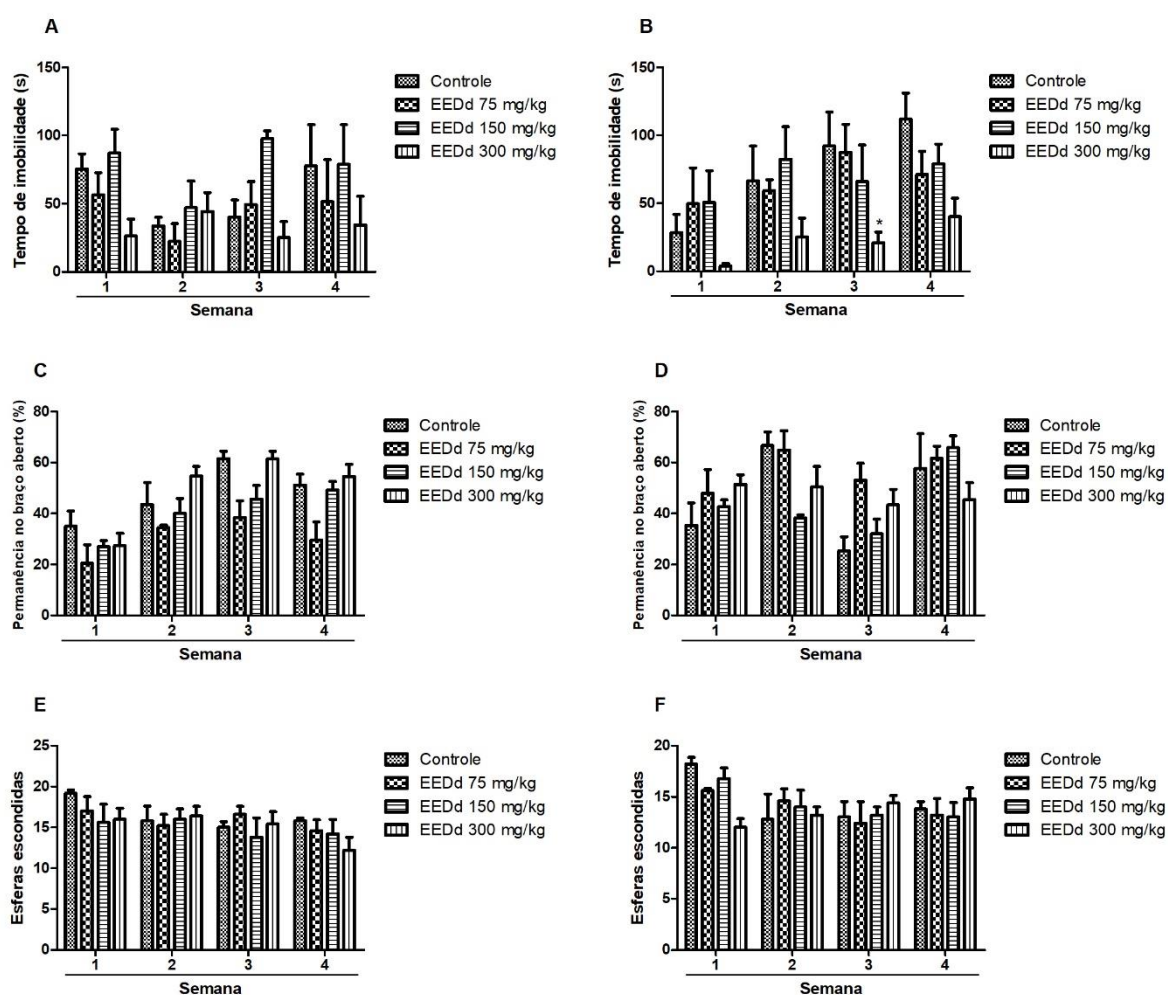
<b>Parâmetros hemtaológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>75 mg/kg</b>	<b>150 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	6,0 ± 0,45	3,58 ± 0,49	4,08 ± 1,64	3,05 ± 0,57
Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	7,79 ± 0,24	8,44 ± 0,21	3,32 ± 0,1	6,86 ± 0,82
Hemoglobina (g/dL)	12,61 ± 0,21	13,26 ± 0,25	13,0 ± 0,57	12,6 ± 0,81
Hematócrito (%)	41,33 ± 1,53	44,6 ± 0,91	44,66 ± 1,41	36,65 ± 4,99
VCM (fL)	52,96 ± 0,38	52,82 ± 0,39	53,54 ± 1,34	53,25 ± 1,15
HCM (pg)	16,23 ± 0,28	15,72 ± 0,14	15,6 ± 0,67	17,55 ± 0,67
CHCM (g/dL)	30,66 ± 0,72	29,74 ± 0,16	29,03 ± 0,65	30,7 ± 1,61
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	956 ± 24,13	859,5 ± 69,54	1004,8 ± 26,27	964,5 ± 87,41
<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>Controle</b>	<b>75 mg/kg</b>	<b>150 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>
AST (U/L)	68,4 ± 8,95	78,02 ± 6,93	88,35 ± 9,04	225,15 ± 49,88**
ALT (U/L)	44,6 ± 6,62	27,9 ± 2,54	40,92 ± 3,12	87,96 ± 21,4
Ureia (mg/dL)	53,94 ± 1,09	41,5 ± 2,16*	73,28 ± 3,20***	54,57 ± 2,53
Creatinina (mg/dL)	0,18 ± 0,03	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,04
Proteína total (g/dL)	42,12 ±	46,75 ±	46,6 ±	42,65 ±

Valores expressos como média ± EPM (n = 5). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 quando comparado com o grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

**Tabela 6.** Efeitos da administração oral de 75, 150 e 300 mg/kg/dia de EEDd (28 dias) nos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos fêmeas.

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>75 mg/kg</b>	<b>150 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	3,83 $\pm$ 0,75	3,12 $\pm$ 0,71	2,46 $\pm$ 0,49	3,675 $\pm$ 0,74
Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	8,16 $\pm$ 0,11	8,31 $\pm$ 0,15	8,14 $\pm$ 0,12	8,53 $\pm$ 0,30
Hemoglobina (g/dL)	13,1 $\pm$ 0,14	13,85 $\pm$ 0,25	13,14 $\pm$ 0,16	13,75 $\pm$ 0,43
Hematócrito (%)	43,35 $\pm$ 0,5	45,55 $\pm$ 1,42	44,08 $\pm$ 0,69	44,67 $\pm$ 1,70
VCM (fL)	53,13 $\pm$ 0,28	54,47 $\pm$ 0,91	53,71 $\pm$ 0,43	51,38 $\pm$ 0,67
HCM (pg)	16,3 $\pm$ 0,19	16,67 $\pm$ 0,14	16,1 $\pm$ 0,19	16,22 $\pm$ 0,08
CHCM (g/dL)	30,71 $\pm$ 0,37	30,6 $\pm$ 0,36	28 $\pm$ 2,01	30,95 $\pm$ 0,37
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	956 $\pm$ 24,13	859,5 $\pm$ 69,54	1004,8 $\pm$ 27,27	964,5 $\pm$ 87,41
<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>Controle</b>	<b>75 mg/kg</b>	<b>150 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>
AST (U/L)	106,5 $\pm$ 8,87	172,6 $\pm$ 47,13	87,23 $\pm$ 8,15	101,05 $\pm$ 17,99
ALT (U/L)	29,9 $\pm$ 1,04	29,92 $\pm$ 1,66	32,05 $\pm$ 4,62	28,72 $\pm$ 3,05
Ureia (mg/dL)	51,33 $\pm$ 3,19	40,3 $\pm$ 3,43	53,17 $\pm$ 2,72	45,82 $\pm$ 2,3
Creatinina (mg/dL)	0,23 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01
Proteína total (g/dL)	41,03 $\pm$ 0,97	41,72 $\pm$ 1,75	42,67 $\pm$ 2,43	37,47 $\pm$ 1,92

Valores expressos como média  $\pm$  EPM (n = 5). VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.



**Figura 3.** Efeito da administração oral de EEDd 75, 150 e 300 mg/kg/dia nos testes comportamentais de suspensão pela cauda em camundongos machos (A) e fêmeas (B), labirinto em cruz elevado em machos (C) e fêmeas (D) e teste de esconder esferas em machos (E) e fêmeas (F) durante 28 dias de exposição. As barras representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* p < 0,05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra pela primeira vez que a dose etnofarmacológica e outras doses diminuíram a resposta inflamatória e à dor, indicando potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e antiartrítico do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Doliocarpus dentatus* em camundongos. Na análise fitoquímica, evidenciou-se a presença de compostos trigonelina, quercetina, isoquercetina, kaempferol, betulina e ácido betulínico que na literatura são correlacionados a efeitos anti-inflamatório e analgésico, pela redução da migração de leucócitos, redução da produção e expressão de moléculas inflamatórias e modulação a resposta imune, elementos fundamentais na inflamação, o que pode fundamentar, em partes, o uso popular de *D. dentatus* contra dor. Nos ensaios de dor induzida por formalina e ácido acético, doses menores de EADd (17 e 30 mg/kg) foram efetivas, já a dose de 30 mg/kg EEDd não se mostrou eficaz, o que, possivelmente se deve aos diferentes mecanismos de ação dos extratos. O EEDd (100 e 300 mg/kg) apresentou maior efetividade nos testes anti-inflamatórios, apresentando um potencial antiartrítico. Os ensaios toxicológicos demonstraram uma DL50 superior a 2000 mg/kg. A administração oral de EDDd durante 28 dias provocou alterações fisiológicas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, no entanto não induziu depressão ou ansiedade. Além disso, o tratamento *in vitro* de EEDd não foi citotóxico. Nos ensaios toxicogenéticos, o EADd não provou danos ao DNA e não modificou a fagocitose esplênica. Estudos adicionais são necessários para que haja evidências de segurança suficientes para o consumo humano.

**7 ANEXOS**

## 7.2 Certidão do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



### Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
Cadastro de Acesso Nº A32F98E

Tipo de Usuário:	UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Responsável pelo cadastro:	05856343948
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
O acesso foi realizado antes de 17/11/2015 ou obteve autorização de acesso antes de 17/11/2015?	Não, sem solicitação de autorização em tramitação
Finalidade do Acesso:	Pesquisa
Estas atividades são baseadas em acesso realizado anteriormente?:	Não
Este cadastro está vinculado a cadastro anterior de remessa?	Não

### Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado

Título da Atividade: Estudo químico e farmacológico dos extratos aquosos das partes aéreas de *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae)

Título da Atividade em inglês:

Resumo da atividade (incluindo objetivos e resultados esperados ou obtidos, conforme o caso)

A medicina popular possui um caráter dúbio: é ao mesmo tempo um patrimônio cultural passado por gerações e um grande risco à população, pois muito é consumido sem qualquer conhecimento da composição daquilo que se consome. Um exemplo é a *Doliocarpus dentatus*, que é uma espécie da família Dilleniaceae encontrada em todas as regiões do Brasil e que tem uso na medicina popular para tratar cistite, dor de inchaço associado a processos inflamatórios, problemas gastrointestinais e retenção urinária. O objetivo desse projeto é encontrar a(s) substância(s) responsáveis por estas atividades biológicas para justificar o uso popular desta espécie, além de isolar e identificar o maior número de compostos nos extratos aquosos ativos das folhas e ramos. Serão preparados extratos aquosos das folhas e ramos de *D. dentatus* de duas maneiras, maceração e infusão, e posteriormente estes serão avaliados para ação anti-inflamatória, por meio de diversos ensaios. A atividade antiproliferativa também será avaliada. Aqueles extratos com os melhores resultados de atividade serão fracionados e as substâncias purificadas. Será obtido o perfil químico por CLAE-DAD e UHPLC-EM de todos os extratos. Espera-se que com este projeto sejam obtidos resultados que comprovem ou não a eficácia do chá de *D. dentatus* em seus usos populares e que seja possível dar uma resposta à sociedade sobre a segurança no uso do chá desta espécie.

Resumo não sigiloso da Atividade em Inglês

(Clicar duas vezes na imagem abre o PDF)



## 7.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA)



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, 30 de março de 2018.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação anti-inflamatória, analgésica (antinociceptiva) e antidepressiva dos compostos, microencapsulado e extratos de *Dolioscarpus dentatus***", registrada sob o protocolo de nº 39/2017, sob a responsabilidade de *Cândida Aparecida Leite Kassuya e Lidiane Schultz Branquinho* – 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 17/11/2017.

<i>Finalidade</i>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	02/04/2018 a 10/10/2018
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus</i> – Wistar / <i>Mus musculus</i>
<i>Nº de animais</i>	676
<i>Peso/idade</i>	50 dias
<i>Sexo</i>	Swiss – 390 machos e 78 fêmeas/ Wistar - 208 machos
<i>Origem</i>	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

*Melissa Negrão Sepulveda*

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA