

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

**Juliana Calil Brondani**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DO PERfil  
TOXICOLÓGICO E ATIVIDADE PROTETORA FRENTE A  
INTOXICAÇÃO POR MERCÚRIO DAS FOLHAS DE *Dolichandra*  
*unguis-cati* L.**

Santa Maria, RS  
2016

**Juliana Calil Brondani**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E  
ATIVIDADE PROTETORA FRENTE A INTOXICAÇÃO POR MERCÚRIO DAS  
FOLHAS DE *Dolichandra unguis-cati* L.**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Melânia Palermo Manfron  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS  
2016

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

Calil Brondani, Juliana  
Composição fitoquímica, avaliação do perfil toxicológico  
e atividade protetora frente a intoxicação por mercúrio  
das folhas de Dolichandra unguis-cati L. / Juliana Calil  
Brondani. - 2016.  
77 p.; 30 cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron  
Coorientadora: Liliane de Freitas Bauermann  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Farmacognosia 2. Plantas Medicinais 3. Toxicidade  
4. Intoxicação mercurial I. Palermo Manfron, Melânia II.  
de Freitas Bauermann, Liliane III. Título.

**Juliana Calil Brondani**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E  
ATIVIDADE PROTETORA FRENTE A INTOXICAÇÃO POR MERCÚRIO DAS  
FOLHAS DE *Dolichandra unguis-cati* L.**

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

**Aprovado em 14 de dezembro de 2016:**

---

**Melânia Palermo Manfron, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Coorientadora)

---

**Patrícia Severo do Nascimento, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Thaylise Vey Parodi, Dr.<sup>a</sup> (URI)**

Santa Maria, RS  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família que sempre me apoiou e me deu suporte em todos os momentos, muito obrigada por sempre acreditarem em mim. Em especial, agradeço meu pai que teve papel fundamental na aventura que foi a coleta do material vegetal e, minha mãe, pelas noites em claro ditando dados de tabelas e gráficos;

À minha orientadora, professora Melânia, pelas contribuições, disponibilidade, incentivo e força para a realização do trabalho. Obrigada por ter confiado em mim e, acima de tudo, ter me orientado com tanta generosidade;

À minha co-orientadora, professora Liliane, pelos conselhos e suporte científico, sempre ressaltando questões fundamentais para a pesquisa, sem as quais este trabalho não teria sido possível;

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de ensino e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos amigos do Labinfo e do Lafex: Rachel, Rafaela, Camila, Iuri, Jocelene, Kamila, Vanessa, Dida, Patrícia, Kássia, Pedro e Robson, os quais tornaram o local de trabalho um ambiente extremamente agradável, agradeço pela ajuda mútua prestada e pelos erros e acertos compartilhados. Em especial, agradeço a Camille, a Fernanda e o Lucas pela amizade, companheirismo, apoio e, principalmente, pela disponibilidade em sempre me ajudar;

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

### COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E ATIVIDADE PROTETORA FRENTE A INTOXICAÇÃO POR MERCÚRIO DAS FOLHAS DE *Dolichandra unguis-cati* L.

AUTORA: Juliana Calil Brondani

ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

COORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

*Dolichandra unguis-cati* L., popularmente conhecida como unha de gato, é uma planta nativa da flora brasileira, pertencente à família Bignoniaceae e muito utilizada para fins terapêuticos e ornamentais. Dentre as principais aplicações na medicina popular, destacam-se as atividades anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-malária e febrífuga. No entanto, estudos a respeito das propriedades biológicas e da segurança na utilização desta espécie vegetal ainda são escassos na literatura. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a composição fitoquímica, o perfil toxicológico e a atividade protetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Dolichandra unguis-cati* (CELD) frente à intoxicação mercurial de ratos Wistar. A composição fitoquímica foi estabelecida por métodos espectrofotométricos e UHPLC/MS. A análise toxicológica compreendeu inicialmente os estudos *in vitro* de citotoxicidade (viabilidade celular), genotoxicidade (DNA cometa) e mutagenicidade (micronúcleos). Em seguida, as toxicidades *ex vivo*, aguda (OECD 423) e subaguda (OECD 407), complementadas pelo teste de letalidade *in vitro* por *Artemia salina*. A ação protetora do extrato, frente a intoxicação de ratos por cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ), foi analisada através de parâmetros bioquímicos, hematológicos e pela determinação da capacidade antioxidante de CELD, por DPPH e  $\beta$ -caroteno. Como resultado, foram identificados e quantificados 12 constituintes químicos do extrato, os quais podem estar relacionados com a potencial atividade antioxidante verificada nos testes por DPPH ( $IC_{50}$  29.18  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $\beta$ -caroteno (39% de inibição da oxidação). Nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , CELD foi capaz de diminuir a viabilidade celular de leucócitos humanos, de maneira dose-dependente, sugerindo uma possível ação anti-tumoral. Além disso, nenhuma das concentrações testadas (1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) resultou em genotoxicidade e mutagenicidade. No estudo de toxicidade aguda, observamos que o tratamento com CELD 2000 mg/kg não causou mortalidade nem mudanças no peso corporal e no comportamento dos ratos, classificando a espécie na categoria 5 da OECD 423, com  $DL_{50}$  estimada entre 2000-5000 mg/kg, dados complementados pela  $DL_{50}$  de 3539.54  $\mu\text{g/mL}$  obtida no teste com *Artemia salina*. A administração subaguda de CELD, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg por 28 dias, também não ocasionou morte de animais, alterações comportamentais e no peso corporal. Em ambos os estudos *ex vivo* foi observada a redução nas dosagens de AST e ALT, indicando um possível efeito hepatoprotetor. O tratamento subagudo mostrou-se ainda eficiente na redução do colesterol total em todas as concentrações testadas, sugerindo uma potencial aplicabilidade de CELD no tratamento de dislipidemias. Por fim, CELD 400 mg/kg atenuou os efeitos tóxicos resultantes da intoxicação por  $HgCl_2$ , através da restauração do balanço oxidativo, diminuição nas dosagens de AST, ALT, BUN e CRE, aumento nos níveis de WBC e reversão da inversão entre linfócitos e neutrófilos. Desta maneira, CELD demonstrou apresentar baixa toxicidade e potenciais atividades biológicas que corroboram para o seu uso como planta medicinal.

**Palavras-chave:** Unha de gato. Ácido clorogênico. Toxicidade. Intoxicação mercurial.

## ABSTRACT

### **PHYTOCHEMICAL COMPOSITION, EVALUATION OF THE TOXICOLOGICAL PROFILE AND PROTECTIVE ACTIVITY AGAINST MERCURY INTOXICATION OF *Dolichandra unguis-cati* L. LEAVES**

AUTHOR: Juliana Calil Brondani  
ADVISOR: Melânia Palermo Manfron  
CO-ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann

*Dolichandra unguis-cati* L., popularly known as unha de gato, is a native plant of Brazilian flora, belonging to the Bignoniaceae family and widely used for therapeutic and ornamental purposes. It has been traditionally used in popular medicine mainly due to its anti-inflammatory, anti-tumor, anti-malarial and febrifuge activities. However, studies on the biological properties and safety in the use of this plant species are still lacking in the literature. Thus, the objective of this work was to investigate the phytochemical composition, toxicological profile and protective activity of the hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD) against the mercurial intoxication of Wistar rats. The phytochemical composition was established by spectrophotometric methods and UHPLC/MS. The toxicological analysis initially comprised *in vitro* studies of cytotoxicity (cell viability), genotoxicity (DNA comet) and mutagenicity (micronuclei). Followed by the *ex vivo* toxicities, acute (OECD 423) and subacute (OECD 407), complemented by the *in vitro* lethality test using *Artemia salina*. The protective action of the extract, against mercury chloride intoxication ( $HgCl_2$ ) of rats, was assessed through biochemical and hematological parameters and by the determination of the antioxidant capacity of CELD, by DPPH and  $\beta$ -carotene. As a result, 12 chemical constituents of the extract were identified and quantified, which may be related to the potential antioxidant activity verified by DPPH ( $IC_{50}$  29.18  $\mu$ g/mL) and  $\beta$ -carotene (39% inhibition of oxidation) tests. In the concentrations of 10 and 100  $\mu$ g/mL, CELD was able to decrease the cellular viability of human leukocytes in a dose-dependent manner, suggesting a possible anti-tumor action. In addition, none of the concentrations tested (1, 10 and 100  $\mu$ g/mL) resulted in genotoxicity and mutagenicity. In the acute toxicity study, we observed that the treatment with CELD 2000 mg/kg did not cause mortality or changes in body weight and behavior of rats, classifying the species as category 5 of OECD 423, with a  $LD_{50}$  estimated between 2000-5000 mg/kg, complemented by the  $LD_{50}$  of 3539.54  $\mu$ g/mL obtained in the test with *Artemia salina*. The subacute administration of CELD, at doses of 100, 200 and 400 mg/kg for 28 days, also did not present death of animals, changes in behavior and body weight. In both *ex vivo* studies, a reduction in AST and ALT dosages was observed, indicating a possible hepatoprotective effect. The subacute treatment was also effective in reducing total cholesterol in all concentrations tested, suggesting a potential applicability of CELD in the dyslipidemia treatment. Ultimally, CELD 400 mg/kg attenuated the toxic effects resulting from  $HgCl_2$  intoxication through restoration of the oxidative balance, decrease in AST, ALT, BUN and CRE dosages, increase in WBC levels and reversal of the inversion between lymphocytes and neutrophils. In this way, CELD demonstrated to present low toxicity and potential biological activities that justify its uses as a medicinal plant.

**Keywords:** Unha de gato. Chlorogenic acid. Toxicity. Mercuric intoxication.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **INTRODUÇÃO**

Figura 1 – Aspectos gerais de *Dolichandra unguis-cati* L. (unha de gato).....19

### **MANUSCRITO 1**

Figure 1 – Graphical representation of CELD effects (1, 10 and 100 µg/mL) on cell proliferation for evaluating the cytotoxicity. NC (negative control), PC (positive control), CELD (*D. unguis-cati* leaves hydroalcoholic crude extract). Bars with the same name letters indicate statistical similarity.....32

Figure 2 – Graphical representation of CELD effects (1, 10 and 100 µg/mL) on DNA damage and micronucleus frequency for evaluating the genotoxicity and mutagenicity, respectively. NC (negative control), PC (positive control), CELD (*D. unguis-cati* leaves hydroalcoholic crude extract). Bars with the same name letters indicate statistical similarity.....33

### **MANUSCRITO 2**

Figure 1 – Photomicrography of liver section from male rats of experimental control (A) and 400 mg/kg treated-group (B); Photomicrography of liver section from female rats of experimental control (C) and 400 mg/kg treated-group (D) of subacute toxicity test exhibiting hepatocyte strings, the centriolobular vein and sinusoid capillaries with physiological aspect. Size bar for comparison 10 µm. H and E (x 100).....44

Figure 2 – Photomicrography of kidney section from male rats of experimental control (E) and 400 mg/kg treated-group (F); Photomicrography of kidney section from female rats of experimental control (G) and 400 mg/kg treated-group (H) of subacute toxicity test showing physiological glomerulus, with preserved architecture of renal and proximal tubules. Size bar for comparison 10 µm. H and E (x 100).....45

### **MANUSCRITO 3**

Figure 1 – Effect of CELD (400 mg/kg), mercury and their combination on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in liver and kidney tissues. Columns represent the mean ± S.D (n = 6). Lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD). Bars with the same symbol indicate statistical similarity.....56

## LISTA DE TABELAS

### **MANUSCRITO 1**

Table 1 – Total phenolic, flavonoid and condensed tannin content of CELD.....32

### **MANUSCRITO 2**

Table 1 – Compounds identified and quantified in CELD through UHPLC/MS.....41

Table 2 – Parameters altered after acute administration of CELD 2000 mg/kg in rats..42

Table 3 – Effects of subacute administration of CELD (100, 200 and 400 mg/kg) for 28 days on biochemical parameters in rats.....43

Table 4 – Effects of subacute administration of CELD (100, 200 and 400 mg/kg) for 28 days on hematological parameters in rats.....43

### **MANUSCRITO 3**

Table 1 – DPPH scavenging capacity of CELD and ascorbic acid.....54

Table 2 – Effect of CELD (400 mg/kg), mercury and their combination on serum biochemical parameters of rats.....54

Table 3 – Effect of CELD (400 mg/kg), mercury and their combination on hematological parameters of rats.....55

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico, do inglês <i>ascorbic acid</i>
ALT	Alanina aminotransferase, do inglês <i>alanine aminotransferase</i>
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP, do inglês <i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase, do inglês <i>aspartate aminotransferase</i>
BUN	Ureia, do inglês <i>blood urea nitrogen</i>
CAT	Catalase
CE	Equivalente de catequina, do inglês <i>catechin equivalent</i>
CELD	Extrato bruto hidroalcóolico das folhas de <i>Dolichandra unguis-cati</i>
CHOL	Colesterol total, do inglês <i>total cholesterol</i>
CRE	Creatinina, do inglês <i>creatinine</i>
DI	Índice de dano ao DNA, do inglês <i>DNA damage index</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	2,2-difenil,1-picrihidrazila
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetra-acetic acid</i>
ERNs/RNS	Espécies reativas de nitrogênio, do inglês <i>nitrogen reactive species</i>
EROs/ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>oxygen reactive species</i>
GAE	Equivalente de ácido gálico, do inglês <i>gallic acid equivalent</i>
GPx	Glutationa peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio / <i>hydrogen peroxide</i>
HCT	Hematórito, do inglês <i>hematocrit</i>
HE	Hematoxilina e Eosina, do inglês <i>hematoxin and eosin</i>
HGB	Hemoglobina, do inglês <i>hemoglobin</i>
HgCl <sub>2</sub>	Cloreto de mercúrio / <i>mercury chloride</i>
HgS	Sulfeto de mercúrio
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%, do inglês <i>50% inhibitory concentration</i>
LD <sub>50</sub>	Dose letal média, do inglês <i>median lethal dose</i>
LPO	Peroxidação lipídica, do inglês <i>lipid peroxidation</i>
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>mean cell corpuscular hemoglobin concentration</i>
MCV	Volume corpuscular médio, do inglês <i>mean corpuscular volume</i>
MDA	Malondialdeído, do inglês <i>malondialdehyde</i>
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento, do inglês <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLT	Plaquetas, do inglês <i>platelets</i>
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PPAR $\alpha$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa, do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
RBC	Eritrócitos, do inglês <i>red blood cells</i>
RDW	<i>Red blood cell distribution width</i>
RE	Equivalente de rutina, do inglês <i>rutin equivalent</i>
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>

SC	Capacidade sequestradora, do inglês <i>scavenging capacity</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>
SOD	Superóxido dismutase, do inglês <i>superoxide dismutase</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	Ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
UHPLC/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês <i>Ultra High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>
WBC	Leucócitos, do inglês <i>white blood cells</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	14
1.1.1	Plantas medicinais no Brasil.....	16
1.1.2	Metabolismo secundário dos vegetais.....	17
1.1.3	A espécie <i>Dolichandra unguis-cati</i> L.....	18
1.2	ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	20
1.2.1	Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.....	21
1.2.2	Toxicidades aguda e subaguda.....	23
1.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
1.4	MERCÚRIO: CARACTERÍSTICAS E TOXICIDADE.....	26
1.5	OBJETIVOS.....	28
1.5.1	Objetivo geral.....	28
1.5.2	Objetivos específicos.....	28
<b>2</b>	<b>MANUSCRITOS.....</b>	<b>29</b>
2.1	MANUSCRITO 1 - DETERMINATION OF CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY OF HYDROETHANOLIC EXTRACT OF <i>Dolichandra unguis-cati</i> L. LEAVES IN HUMAN LEUKOCYTES.....	29
	Abstract.....	29
	Resumen.....	30
1.	Introduction.....	30
2.	Materials and methods.....	31
2.1.	<i>Botanical material and extraction procedure</i> .....	31
2.2.	<i>Phytochemical analysis</i> .....	31
2.3.	<i>Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity evaluations against human leukocytes</i> .....	31
2.3.1.	<i>Cytotoxicity assay</i> .....	31
2.3.2.	<i>Genotoxicity assay</i> .....	31
2.3.3.	<i>Mutagenicity assay</i> .....	31
2.4.	<i>Statistical analysis</i> .....	32
3.	Results.....	32
3.1.	<i>Total phenolic, flavonoid and condensed tannin contents</i> .....	32
3.2.	<i>Cytotoxicity evaluation</i> .....	32
3.3.	<i>Genotoxicity and mutagenicity assays</i> .....	33
4.	Discussion.....	33
5.	Conclusion.....	34
6.	References.....	34
2.2	MANUSCRITO 2 – EVALUATION OF ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY OF HYDROETHANOLIC EXTRACT OF <i>Dolichandra unguis-cati</i> L. LEAVES IN RATS.....	36
	Abstract.....	36
1.	Introduction.....	37
2.	Materials and methods.....	38
2.1.	<i>Plant material</i> .....	38
2.2.	<i>Obtention of extract</i> .....	38
2.3.	<i>Chemicals and reagents</i> .....	38
2.4.	<i>Phytochemical characterization: UHPLC/MS</i> .....	38

2.5.	<i>Brine shrimp lethality test</i> .....	39
2.6.	<i>Experimental animals</i> .....	39
2.7.	<i>Acute toxicity test</i> .....	39
2.8.	<i>Subacute toxicity test</i> .....	40
2.8.1.	<i>Histopathology</i> .....	40
2.9.	<i>Biochemical and hematological analysis</i> .....	40
2.10.	<i>Open Field test</i> .....	40
2.11.	<i>Lipid peroxidation/in vivo antioxidant activity of CELD</i> .....	41
2.12.	<i>Statistical analysis</i> .....	41
3.	Results.....	41
3.1.	<i>UHPLC/MS analysis</i> .....	41
3.2.	<i>Bioactivity of CELD on A. salina larvae</i> .....	42
3.3.	<i>Acute toxicity test</i> .....	42
3.4.	<i>Subacute toxicity test</i> .....	42
3.5.	<i>Histopathology</i> .....	44
4.	Discussion.....	45
5.	Conclusion.....	46
	Acknowledgments.....	46
	References.....	47
2.3	MANUSCRITO 3 – THE PROTECTIVE EFFECT OF <i>Dolichandra unguis-cati</i> LEAVES IN MERCURY-INDUCED ACUTE TOXICITY IN RATS.....	49
	Abstract.....	50
1.	Introduction.....	50
2.	Materials and methods.....	50
2.1.	<i>Plant material</i> .....	51
2.2.	<i>Chemical and reagents</i> .....	51
2.3.	<i>Antioxidant capacity in vitro</i> .....	51
2.3.1.	<i>Scavenging activity on DPPH</i> .....	51
2.3.2.	$\beta$ -carotene/linoleic acid assay.....	51
2.4.	<i>Animals and experimental protocol</i> .....	52
2.5.	<i>Blood analysis</i> .....	52
2.6.	<i>Oxidative stress/Antioxidant status in vivo</i> .....	52
2.6.1.	<i>Lipid peroxidation</i> .....	52
2.6.2.	<i>Antioxidant enzymatic determinations</i> .....	53
2.7.	<i>Statistical analysis</i> .....	53
3.	Results.....	53
3.1.	<i>Antioxidant capacity in vitro</i> .....	53
3.2.	<i>Biochemical and hematological parameters</i> .....	54
3.3.	<i>Oxidative stress/Antioxidant status in vivo</i> .....	55
4.	Discussion.....	56
5.	Conclusion.....	58
	Acknowledgments.....	58
	Conflict of interest.....	58
	References.....	58
3	<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
	<b>ANEXO A – CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/UFSM</b> .....	73

<b>ANEXO B – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO BOLETÍN LATINO AMERICANO Y DEL CARIBE DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais na terapêutica constitui uma prática milenar, culturalmente baseada na sabedoria popular e difundida através das gerações. Desde os tempos primórdios, o homem interage com o ambiente que o cerca, observando e explorando suas potencialidades de modo a obter o conhecimento necessário para suprir suas necessidades de sobrevivência. Dentre as diversas aplicações dos recursos vegetais que contribuíram para melhorar a qualidade de vida da sociedade, destacam-se os usos como alimento, matéria-prima para a fabricação de roupas, ferramentas e construção de moradias, além da difundida utilização no tratamento de diferentes enfermidades (ALVIM et al., 2006; SIVIERO et al., 2012).

Na antiguidade, as plantas medicinais eram os principais recursos terapêuticos disponíveis às civilizações para tratar seus males e, a escassez de tecnologia e conhecimento científico tornavam esta prática genuinamente empírica. A descoberta humana das propriedades biológicas dos vegetais foi moldada através da verificação dos efeitos, ora benéficos ora tóxicos, que a ingestão das plantas causava ao organismo. Neste contexto, a primeira referência escrita sobre o uso de plantas como remédios data de 2800 a.C., na obra chinesa Pen Ts'ao ("A Grande Fitoterapia"), de Shen Nung. O Papiro Ebers (1500 a.C.) representa outro documento histórico importante, no qual estão mencionados tratamentos a base de extratos vegetais que até os dias atuais são recomendados por fitoterapeutas. Na Grécia antiga, os valores terapêuticos e tóxicos conhecidos das plantas foram reunidos por Hipócrates (460-377 a.C.) na obra "Corpus Hipocratium", a qual foi ainda complementada com a indicação do remédio vegetal adequado para o tratamento de diferentes enfermidades (ELDIN; DULFORD, 2001; TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Considerado o pai da botânica e da farmacognosia, Theophrastus (300 a.C.) descreveu as qualidades e peculiaridades de espécies vegetais na obra "História das Plantas", além de reunir dados sobre formulações a base de plantas no seu "Tratado dos Odores". No início da Era Cristã, na obra "De matéria médica" do grego Dioscórides, foram catalogados aproximadamente 600 diferentes tipos de plantas tradicionalmente usadas com fins medicinais pela população, sendo esta a principal referência médica ocidental até o Renascimento. Galenus escreveu cerca de 83 livros

apresentando drogas de origem vegetal, combinadas com diversas outras formulações e métodos de manipulação. Outra figura importante na arte de curar foi o alquimista Paracelsus, que lançou as bases da medicina natural, sendo assim um dos principais responsáveis pelo avanço da terapêutica (DEVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

A partir do século XVI, a utilização de plantas medicinais entrou em um período de declínio, consequência da revolução intelectual e industrial. Nessa época, as importantes conquistas nos campos da ciência e filosofia, associadas aos avanços na urbanização e tecnologia, marcaram o surgimento das indústrias farmacêuticas e o desenvolvimento de medicamentos alopáticos. Aos poucos, a sociedade foi sendo "medicalizada" e inserida na nova ordem cultural fundada em moldes capitalistas, no qual práticas populares foram gradativamente sendo desacreditadas e marginalizadas por não terem suas ações cientificamente comprovadas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Após a década de 60, as indústrias farmacêuticas, cada vez mais consolidadas, passaram a se desinteressar pela busca de novas substâncias de origem vegetal por acreditarem que já haviam sido identificados e isolados os principais compostos ativos provenientes da flora. Além disso, a população, sentindo-se atraída pelo apelo de que os medicamentos sintéticos teriam uma cura mais efetiva e rápida, também passou a preferir o uso dos recursos naturais em prol dos fármacos sintéticos (RATES, 2001; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Contudo, nos últimos anos, esse panorama passou a ser modificado e as plantas medicinais readquiriram sua importância na terapêutica. Dentre os fatores que contribuíram para reativar esse interesse, destacam-se o baixo custo de fitoterápicos quando comparados aos medicamentos alopáticos, a dificuldade de acesso da população aos sistemas de saúde pública e os efeitos adversos causados por alguns fármacos sintéticos (BADKE et al., 2012; LIMA et al., 2014; LOURES et al., 2010). Cabe ainda salientar que, segundo a OMS, 80% da população dos países em desenvolvimento depende diretamente de plantas medicinais para seu tratamento (WHO, 2011).

Além disso, a existência de doenças ainda sem cura conhecida, juntamente com os avanços tecnológicos e o desenvolvimento de novas técnicas de isolamento de substâncias ativas, permitiram que os grandes laboratórios farmacêuticos identificassem mais rapidamente compostos ativos a partir de misturas complexas,

como os extratos vegetais. Ressurgindo, assim, também o interesse científico pelo uso de plantas medicinais, como alternativa para complementar as práticas de saúde vigentes (majoritariamente baseadas em medicamentos alopaticos) e como fonte de novos princípios ativos ainda desconhecidos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Nesse sentido, é importante salientar a diferença entre planta medicinal e fitoterápico. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é todo e qualquer vegetal, cultivado ou não, que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos. Já fitoterápico, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, é todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico. Na preparação de um fitoterápico podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente, porém não podem estar incluídas substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004; WHO, 1998).

### **1.1.1 Plantas medicinais no Brasil**

No Brasil, a base do conhecimento a respeito do uso de plantas medicinais originou-se na fusão das culturas indígena, européia e africana. A contribuição indígena se deu através dos índios que habitavam o país, os quais liderados por seus pajés, utilizavam um grande número de plantas no tratamento de seus males, aprimorando e repassando o conhecimento sobre o uso das ervas nativas através dos anos, para as futuras gerações. Os colonizadores, marinheiros e mercadores europeus complementaram essa base cultural acrescentando os recursos naturais que, na Europa, já eram empregados na terapêutica. O período da escravidão também contribuiu para o fortalecimento da fitoterapia, na medida em que os escravos africanos que aqui chegavam traziam consigo novas plantas e as introduziam na cultura popular brasileira (ALMEIDA, 2011).

A partir desse processo histórico, a prática da fitoterapia foi se consolidando ao longo dos anos e sendo, atualmente, fomentada por políticas públicas. Nesse contexto, destacam-se a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), as quais foram consideradas como parte integrante dos sistemas de saúde (BRASIL,

2006a; BRASIL, 2006b). Em 2009, as espécies vegetais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) e que tem seu uso financiado pelo Governo Federal foram organizadas em um banco de dados (RENISUS) para estimular a pesquisa e a ampliação do conhecimento a respeito de suas propriedades terapêuticas e tóxicas (BRASIL, 2009).

Em 20 de abril de 2010, a portaria GM/MS, número 886, instituiu, no âmbito do SUS, a Farmácia Viva como a responsável por realizar todas as etapas da utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, desde o cultivo, a coleta, o processamento e o armazenamento das espécies vegetais, até a sua manipulação e dispensação na forma de preparações magistrais e oficinais (BRASIL, 2010). Mais ainda, o Caderno de Atenção Básica número 31 do Ministério da Saúde, intitulado "Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica" foi desenvolvido para estimular e fortalecer a fitoterapia com ênfase na atenção básica/saúde da família (BRASIL, 2012). Em decorrência dos achados científicos obtidos nos últimos anos envolvendo compostos naturais e do incentivo federal para a pesquisa dos mesmos, muitos estudos estão sendo desenvolvidos objetivando uma melhor caracterização destes compostos, como potenciais futuros fármacos.

### **1.1.2 Metabolismo secundário dos vegetais**

Por apresentarem forma séssil, ou seja, não possuírem capacidade de locomoção, as plantas são impedidas de se deslocarem quando submetidas a situações ambientais menos favoráveis ou estressantes, como a exposição a radiação solar e o ataque de insetos e herbívoros. Devido a isto, ao longo da sua história evolutiva, os vegetais desenvolveram outras estratégias de defesa que os favorecessem a sobrevivência das espécies no ecossistema. Uma das formas encontradas por estes organismos, para lidarem com as situações adversas a que estão expostos, foi a produção de compostos denominados metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2010).

Os produtos do metabolismo secundário de plantas são substâncias produzidas em pequenas quantidades e que, embora não estejam relacionadas a funções vitais dos vegetais, apresentam importantes propriedades que garantem vantagens aos mesmos, como atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, proteção contra raios solares, defesa contra o ataque de patógenos e benefícios em

competições com outros vegetais. Por apresentarem diferentes rotas bioquímicas e metabólicas de síntese, a produção destas substâncias varia de acordo com a espécie vegetal, podendo, inclusive, ser utilizada como ferramenta na classificação taxonômica das plantas (SIMÕES et al., 2010; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os compostos fenólicos representam uma das maiores classes de metabólitos secundários produzidas pelas plantas, constituindo um diversificado grupo de derivados de fenilalanina e tirosina. Nos vegetais, podem ser encontrados na forma livre ou complexados à açúcares (glicosídeos), proteínas e outros substratos, englobando desde moléculas simples até aquelas com alto grau de polimerização. Quimicamente, caracterizam-se pela presença de pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por grupamento hidroxila (LEE et al., 2005; ROBBINS, 2003). Flavonóides e ácidos fenólicos estão entre os principais grupos de compostos fenólicos encontrados nas plantas, os quais têm reconhecida propriedade antioxidante e abrangente atuação a nível fisiológico, fatos que reiteram a importância destes compostos na terapêutica.

### **1.1.3 A espécie *Dolichandra unguis-cati* L.**

Dentre as diversas espécies vegetais selecionadas para a realização de estudos farmacológicos e toxicológicos, encontra-se *Dolichandra unguis-cati*. Popularmente conhecida como "unha de gato", "cipó de gato" e "cipó de morcego", esta espécie pertence a família Bignoniaceae e é considerada nativa da flora brasileira. Não endêmica, pode também ser encontrada em vários países da América Latina, além do Egito e da Índia Ocidental. Trata-se de uma trepadeira florífera e ornamental muito cultivada no sul do Brasil sobre cercas e pérgolas. É perene, caducifólia e vigorosa, com base lenhosa e ramos terminais pendentes, dotados de ganchos aderentes utilizados pela planta para se fixar em árvores e obstáculos. As raízes se caracterizam pela presença de tubérculos ou batatas destinadas ao armazenamento de alimentos (BOYNE et al., 2013; LORENZI; MATOS, 2008).

Como exemplificado na Figura 1, suas folhas são simples ou compostas, bifoliadas ou trifoliadas, subcoriáceas, quase glabras, opostas e podem apresentar variação morfológica ligada à diferenças genotípicas e plasticidade adaptativa de

acordo com os diferentes ambientes que habita. Apresenta flores tubulosas de cor amarelo-ouro, formadas no final do inverno, antes do surgimento da nova folhagem. Os frutos são cápsulas deiscentes, alongadas e finas, contendo numerosas sementes aladas, as quais se dispersam com facilidade pelo vento. É importante ressaltar ainda que esta espécie apresenta uma lista de, aproximadamente, 40 sinonímias botânicas, das quais *Macfadyena unguis-cati* é a mais relevante (BOYNE et al., 2013; LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 1 - Aspectos gerais de *Dolichandra unguis-cati* L. (unha de gato).



Fonte: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr\\_060526-8114\\_Macfadyena\\_unguis-cati.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr_060526-8114_Macfadyena_unguis-cati.jpg)>. Acesso em 18/11/2016.

Largamente utilizada com propósitos ornamentais, *Dolichandra unguis-cati* também é reconhecida na medicina tradicional brasileira e internacional por seus efeitos benéficos na saúde humana. Suas propriedades biológicas podem ser atribuídas aos constituintes químicos até então identificados na espécie, como por exemplo: ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ácido quinóvico, lupeol, β-sitosterol, β-sitosterilglicosídeo, alantoína, lapachol, quercitrina e vicenina 2. Com base na tradição de origem indígena, suas folhas e turbéculos são empregados na medicina caseira em diversas regiões do Brasil contra picada de cobras, malária, diarréia, febre, reumatismo, inflamação intestinal, tumores e para induzir a diurese (ABOUTABL et al., 2008; DUARTE et al., 2000; MORS et al., 2000).

Segundo Gomes e colaboradores (2010), a ação como antídoto contra picada de cobras peçonhentas pode ser explicada pela presença de ácido quinóvico na composição química dessa planta, uma vez que este composto tem a capacidade de inibir a fosfodiesterase I presente nos venenos. A atividade anti-tumoral pode ser relacionada com a presença de lapachol, o qual apresenta ação inibitória sobre a oxidação e a fosforilação mitocondrial envolvidas no processo de carcinogênese (DUARTE et al., 2000). A tribo Wayápi, das Guianas, utiliza a planta inteira em chá, por decocção, como febrífuga em aplicações externas na forma de banho. Já os índios da tribo Palikur, também das Guianas, empregam tanto a planta inteira, como as folhas e raízes associadas à casca do ipê, também na forma de decocção adoçada com mel para tratamento da tosse (LORENZI; MATOS, 2008).

## 1.2 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Apesar do crescente interesse popular em terapias naturais observado nos últimos anos, muitas plantas medicinais ainda não foram avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança. O surgimento do conceito "natural" fez com que matérias-primas de origem vegetal fossem vistas como produtos saudáveis, sem risco algum à saúde. Conceito equivocado, já que muitas plantas contém substâncias capazes de exercer efeitos tóxicos sobre o organismo (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Nesse sentido, podemos citar o Confrei (*Symphytum officinalis*), vegetal popularmente utilizado no tratamento da artrite, mas que pode causar hepatite, elevação da bilirrubina e das enzimas AST e ALT. Outro exemplo é a Kava (*Piper methysticum*), usada na medicina popular como relaxante e no combate à infecções do trato urogenital, mas que, no entanto, pode ser tóxica causando falência renal, fotossensibilidade, alergias e sedação (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

É inegável que o uso popular de plantas medicinais não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Uma vez que as plantas não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético, a preconização ou a autorização oficial do seu uso na terapêutica deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é menor do que os possíveis benefícios (CARNEIRO et al., 2014). Dependendo da forma de utilização, via de administração, parte vegetal utilizada, modo de preparo e tempo de

tratamento, uma determinada planta pode apresentar tanto ação terapêutica quanto tóxica (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

Além de um possível efeito tóxico direto, as plantas podem apresentar ações indesejáveis indiretas ao interagir com outros medicamentos. A associação com plantas pode aumentar, diminuir ou anular o efeito de medicamentos alopáticos em diferentes intensidades. Os mecanismos para a maioria das interações planta-medicamento não são totalmente conhecidos, no entanto, diversos casos clínicos documentam os riscos dessa associação, como por exemplo o *Ginkgo biloba* reduzindo as concentrações plasmáticas de omeprazol e ritonavir, e o *Hypericum perforatum* que diminui a concentração sanguínea da digoxina (CHEN et al., 2011; IZZO; ERNST, 2009).

No Brasil, o consumo de plantas medicinais é feito com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, as quais são propagadas por usuários ou comerciantes, sendo que, frequentemente, as plantas são empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Apesar da pouca atenção dada ao assunto, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública e, por esta razão, os estudos a respeito dos seus riscos toxicológicos são de fundamental importância. Todavia, as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, bem como é o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos e lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Sabe-se que a utilização de compostos vegetais na terapêutica requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agronômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (BRASIL, 2004). É extremamente importante identificar os efeitos adversos, quantificar os riscos e padronizar termos, de maneira a permitir o uso seguro e eficaz de plantas medicinais. Dessa forma, estudos toxicológicos *in vitro* e *ex vivo* são de fundamental importância, pois, permitem inferir os possíveis efeitos nocivos de substâncias em organismos vivos. (OGA, 2008).

### **1.2.1 Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade**

Os ensaios *in vitro* são importantes ferramentas na análise inicial dos efeitos deletérios de xenobióticos. Estes testes caracterizam-se por serem confiáveis e

fornecerem resultados rápidos em nível de células individuais, utilizando amostras celulares extremamente pequenas.

Nesse âmbito, a citotoxicidade de extratos vegetais em cultivo celular indica a capacidade intrínseca que, determinados compostos, tem de ocasionar a morte celular em consequência aos danos gerados a importantes propriedades celulares, como a perda da função mitocondrial, mudanças na morfologia fisiológica e alterações na replicação das células. Sabe-se ainda que substâncias ativas que apresentam propriedades citotóxicas podem ser avaliadas quanto a sua potencial atividade antitumoral, inseticida e larvícida. Nesse tipo de estudo, diferentes parâmetros são analisados visando a identificação dos danos celulares, sendo que, geralmente, o critério mais utilizado é o da viabilidade celular (WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005).

No que tange aos danos no material genético, tanto genotoxicidade quanto mutagenicidade são ensaios capazes de identificar lesões no DNA ou RNA causadas, por exemplo, por constituintes de extratos vegetais. Estes testes baseiam-se na afinidade química e física que determinados compostos têm com os ácidos nucleicos, identificando, assim, substâncias com potencial risco toxicológico. Um agente genotóxico é definido como aquele capaz de interagir com o material genético formando adutos, alterações oxidativas e quebras na molécula de DNA/RNA. Geralmente, o próprio organismo dispõe de meios para reparar estes danos ou, até mesmo, eliminar as células alteradas (FONSECA; PEREIRA, 2004).

No entanto, caso estas lesões se tornem permanentes, ou seja, hereditariamente transmitidas às células filhas durante o processo de replicação, o agente agressor passa a ser denominado mutagênico. Pequenos corpos, denominados micronúcleos, contendo DNA e localizados no citoplasma das células são uma das principais alterações mutagênicas passíveis de identificação. Estes corpos, que podem aparecer mais de uma vez na mesma célula, se originam a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos, resultantes de quebras isocromatídicas, cromatídicas ou de disfunções do fuso mitótico, e são observados por microscopia ótica (OBE et al., 2002).

### 1.2.2 Toxicidades aguda e subaguda

Sabe-se que diversos fatores podem influenciar os efeitos tóxicos de uma substância, tais como idade, gênero, peso corpóreo, estados nutricionais e patológicos. Estas são algumas das razões que tornam importante a realização de ensaios *ex vivo* de maneira a complementar e ratificar os dados obtidos por estudos *in vitro*.

Com relação aos ensaios *ex vivo*, a toxicidade aguda é caracterizada pelos efeitos adversos ocorridos após a administração de um xenobiótico em dose única ou múltiplas, dentro de um curto intervalo de tempo (24 horas). Trata-se de um estudo que tem por objetivo principal avaliar a taxa de mortalidade dos animais, sendo que, normalmente, é possível a determinação da dose letal ( $LD_{50}$ ). Este parâmetro, que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população, é uma importante ferramenta para a determinação da toxicidade relativa das substâncias. Além da letalidade, os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda auxiliam na identificação de órgãos alvo e fornecem informações para a escolha de doses a serem usadas em estudos mais prolongados, como a toxicidade subaguda (GUPTA, 2016). Este ensaio pode ainda ser complementado com o teste de toxicidade aguda *in vitro* por *Artemia salina*, o qual também analisa a letalidade de substâncias.

Já a toxicidade subaguda refere-se aos efeitos nocivos e cumulativos resultantes de exposições repetidas a um xenobiótico, durante um período de 28 dias. Nesse tipo de estudo são utilizadas, pelo menos, três doses experimentais (mínima, intermediária e máxima), sendo que a dose máxima não deve produzir um índice de letalidade acima de 10%. Determinar a maior dose na qual não se observam efeitos adversos, estudar mais efetivamente a susceptibilidade de órgãos alvo e prover informações sobre dosagens para estudos de toxicidade crônica compreendem os principais objetivos deste tipo de estudo (OGA, 2008).

Atualmente, existem protocolos alternativos nos quais o número de animais utilizados nos experimentos é reduzido quando comparados àqueles métodos tradicionais. Entre eles, encontram-se os guias para os testes de toxicidade oral aguda e subaguda da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423 e 407, respectivamente). Mesmo não calculando uma  $LD_{50}$  exata, a OECD 423

fornecer resultados aproximados que permitem inserir a substância em classes de toxicidade definidas pelo respectivo guia.

### 1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO

Dentre as principais propriedades biológicas dos vegetais, que contribuíram para o ressurgimento do interesse no uso de plantas na terapêutica, está a capacidade antioxidante dos mesmos, seja através do sequestro de radicais livres/espécies reativas e/ou por estimular os sistemas de defesa intrínsecos do organismo.

O termo "radical livre" é frequentemente usado para designar um átomo ou uma molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, "sem par" nos orbitais externos, o que torna essa substância altamente reativa. Esta definição engloba, por exemplo, o átomo de hidrogênio, a maioria dos íons de metais de transição, o oxigênio molecular e o óxido nítrico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Já as terminologias Espécies Reativas de Oxigênio e Espécies Reativas de Nitrogênio (EROs e ERNs) são mais abrangentes, incluem as espécies radicais livres e outras que, apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (RIBEIRO et al., 2005). Como exemplo desses compostos, podemos destacar: peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical superóxido, radical hidroxil, radical alcoxil e radical peroxil (VASCONCELOS et al., 2007).

Sabe-se que a produção de EROs e de ERNs é parte integrante e contínua do metabolismo celular aeróbico e que estes desempenham papéis importantes em diversas condições fisiológicas quando presentes em baixas concentrações, tais como respostas celulares, defesa contra agentes infecciosos (produzidos para eliminar o agente agressor durante a fagocitose) e sinalização celular. Além disso, o radical óxido nítrico tem fundamental importância no controle da pressão sanguínea (vasodilatador), na neurotransmissão, na regulação imune e no relaxamento muscular (VALKO et al., 2007). Quando a concentração de EROs e ERNs está aumentada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que, geralmente, consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (SCHAFFER; BUETTNER, 2001).

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, tenha a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz e por meio de diferentes mecanismos de

ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (CLARKSON; THOMPSON, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003). Os sistemas de defesa antioxidantes são classificados em dois grupos: endógeno (enzimático) e exógeno (não enzimático). O sistema endógeno é o primeiro a agir contra as espécies reativas e, nesse grupo, estão presentes enzimas capazes de bloquear o início da oxidação, como por exemplo: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). A SOD age acelerando o processo fisiológico de transformação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), já as enzimas CAT e GPx atuam com o mesmo propósito, complementando a ação da SOD ao impedir o acúmulo de  $H_2O_2$  no organismo. O sistema exógeno inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, compreendendo polifenóis, licopeno, luteína, ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol e β-caroteno (precursores da vitamina E e A, respectivamente) e, entre os minerais, destacam-se zinco, selênio, cobre e magnésio.

No entanto, a produção excessiva de espécies de oxigênio e nitrogênio durante processos patofisiológicos, associada a uma defesa antioxidante insuficiente para restabelecer o balanço redox, pode desencadear o estresse oxidativo, caracterizado por danos profundos em tecidos e pelo consequente desenvolvimento de patologias (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). Em uma situação de estresse oxidativo, as espécies reativas podem danificar muitas moléculas biológicas, incluindo os lipídios, as proteínas, os carboidratos, as vitaminas e o DNA. Em decorrência da peroxidação lipídica, as membranas celulares são um dos alvos mais atingidos por este processo, o que leva à alterações na estrutura e na permeabilidade destas, com perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas (HALLIWELL, 2007; POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998).

Além disso, ao combinar com o DNA das células, as espécies reativas podem levar a uma alteração do código genético e, consequentemente, a uma multiplicação celular desordenada, levando a aceleração do envelhecimento e ao desenvolvimento de tumores (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013). Na literatura, é possível encontrar uma grande diversidade de doenças associadas ao estresse oxidativo: aterosclerose (LI; HORKE; FORSTERMANN, 2014), Doença de Alzheimer (YAN; WANG; ZHU, 2013), Doença de Parkinson (HAUSER; HASTINGS, 2013), Esclerose Amiotrófica Lateral

(NAGASE et al., 2016), inflamações crônicas (SAHU et al., 2013), diabetes (ROCHETTE et al., 2014), entre outras.

#### 1.4 MERCÚRIO: CARACTERÍSTICAS E TOXICIDADE

A potencial atividade antioxidante manifestada por diversas plantas medicinais vem sendo utilizada como base científica para justificar estudos a respeito dos efeitos protetores que extratos vegetais podem desempenhar frente intoxicações por mercúrio. Considerado um dos mais tóxicos metais de transição, o mercúrio pode se apresentar no ambiente sob três formas químicas, sendo que todas causam graves efeitos deletérios ao organismo e são facilmente interconversíveis na natureza.

O mercúrio elementar (ou metálico) é líquido, de coloração branco-prateada, inodoro e envolvido em processos geológicos naturais, como em erupções vulcânicas e dissolução de rochas. Devido a sua fácil volatilização e alta lipossolubilidade, esta forma mercurial tem rápida passagem pela membrana alveolar, fácil penetração na barreira hemato-encefálica e placenta, sendo rapidamente distribuída na circulação sanguínea e depositando-se, principalmente, no sistema nervoso central (AZEVEDO, 2003).

Já os compostos inorgânicos de mercúrio se formam naturalmente no ambiente quando há a combinação entre o mercúrio elementar e outros elementos, como enxofre e oxigênio, resultando na formação de sais (ex:  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{HgS}$ ). Tem baixa volatilização e, por isso, os casos de intoxicação geralmente são consequência de uma exposição por via oral e não por via inalatória. Por apresentar baixa lipossolubilidade, esta forma mercurial não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e causar danos a nível de sistema nervoso, tendo por característica o acúmulo nos tecidos hepático e renal (AZEVEDO, 2003).

Por fim, os compostos orgânicos de mercúrio são formados quando há a combinação do mercúrio elementar com carbono, os chamados compostos organomercuriais (ex: metilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio). Esta forma é considerada a mais tóxica entre as três citadas, uma vez que além de ter elevada lipofilicidade, o radical orgânico associado a estrutura permite a rápida entrada do metal na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis ao sistema nervoso central (NEVADO et al., 2010).

Por se tratar de um poluente do solo, do ar, dos alimentos e da água, a exposição humana ao mercúrio é uma situação difícil de ser evitada. Nesse sentido, atenção especial deve ser dada a determinados grupos populacionais no que se refere a intensidade dessa exposição, entre eles: os trabalhadores ocupacionalmente expostos ao mercúrio em indústrias e no garimpo do ouro; comunidades vizinhas a fontes de poluição por mercúrio e populações ribeirinhas e indígenas que dependem da pescada como fonte de proteínas (DRISCOLL et al., 2013).

Industrialmente, a maior aplicação do mercúrio metálico se dá nos garimpos, em células eletrolíticas para a produção do cloro e soda, na fabricação de termômetros, barômetros, lâmpadas e aparelhos elétricos. A aplicação dos compostos inorgânicos ocorre principalmente na indústria de eletrodos, polímeros sintéticos e como agentes antissépticos. Dentre as aplicações dos compostos orgânicos, destacam-se os usos como fungicida e inseticida. Já a exposição ambiental é provocada, principalmente, pela ingestão de alimentos, como por exemplo, peixes e frutos do mar que habitam águas contaminadas por metais pesados, ou seja, que são mais susceptíveis ao acúmulo de mercúrio no tecido muscular (LI et al., 2014).

Por se depositar principalmente nos rins, fígado, sangue, aparelho respiratório, sistema nervoso central e periférico, este metal é frequentemente associado a graves quadros de intoxicação, denominados hidrargirismo (KAUR; ASCHNER; SYVERSEN, 2006). Dentre os efeitos nocivos provocados por uma intoxicação aguda, destacam-se bronquite, edema pulmonar, lesões hepáticas e renais, gosto metálico na boca, dores em articulações, convulsões, alucinações, distúrbios emocionais, anormalidade nos reflexos, confusão mental, coma e morte. Já a exposição crônica está relacionada com o aparecimento de inflamações gengivais, amolecimento dos dentes, inchaço das glândulas salivares, cardiomiopatia, anemia, perda de memória e do controle muscular, entre outros (CAROCCI et al., 2014; RICE et al., 2014).

Os principais mecanismos moleculares citados na literatura para explicar os efeitos deletérios do mercúrio sobre organismos vivos incluem: o estresse oxidativo, a ação sobre a rede de microtúbulos e a ação nos mecanismos de reparo do DNA. O primeiro caso se explica pela ação supressora deste metal sobre enzimas antioxidantes e pelos radicais livres gerados durante o seu próprio metabolismo, pelo citocromo P450. O segundo mecanismo é caracterizado pelo desarranjo na distribuição cromossômica durante a mitose, quando o mercúrio age na rede de microtúbulos e, a terceira via de toxicidade deste metal representa o prejuízo no

sistema de reparo do DNA, o qual é responsável por proteger a integridade das informações do genoma (CRESPO-LOPEZ et al., 2009). Desta maneira, compostos naturais com atividade antioxidante podem atenuar o estresse oxidativo gerado em um quadro de intoxicação mercurial, diminuindo assim, a gravidade dos efeitos nocivos atribuídos a este metal.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

Identificar constituintes fitoquímicos no extrato das folhas de *Dolichandra unguis-cati*, determinar o perfil toxicológico empregando-se métodos *in vitro* e *ex vivo*, bem como a atividade protetora do extrato frente à intoxicação mercurial aguda de ratos Wistar.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Obter extrato hidroetanólico 70% das folhas de *Dolichandra unguis-cati* (CELD);
- Identificar e quantificar constituintes fitoquímicos em CELD;
- Determinar as atividades citotóxica, genotóxica e mutagênica de CELD em leucócitos humanos;
- Avaliar a toxicidade aguda *ex vivo* de CELD em ratos Wistar, segundo o guia OECD 423;
- Avaliar a toxicidade aguda *in vitro* de CELD através de ensaio com microcrustáceos;
- Avaliar a toxicidade subaguda *ex vivo* de CELD em ratos Wistar, segundo o guia OECD 407;
- Determinar a capacidade antioxidante de CELD através de ensaios *in vitro* e *ex vivo*;
- Determinar as atividades hepato e nefroprotetoras de CELD frente exposição mercurial aguda de ratos Wistar.

## 2 MANUSCRITOS

Os materiais e métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de três manuscritos. Cada manuscrito está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão ou publicação do mesmo.

### 2.1 MANUSCRITO 1

#### **DETERMINATION OF CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY OF HYDROETHANOLIC EXTRACT OF *Dolichandra unguis-cati* L. LEAVES IN HUMAN LEUKOCYTES**

O presente manuscrito foi submetido ao periódico *Boletín Latino Americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.

**Determination of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in human leukocytes**

Determinación de la citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad del extracto hidroalcohólico de *Dolichandra unguis-cati* L. hojas en leucocitos humanos

**Juliana Calil Brondani<sup>I,\*</sup>, Lucas Damo Marangoni<sup>I</sup>, Rachel de Lima<sup>I</sup>, Michel Mansur Machado<sup>II</sup>, Melânia Palermo Manfron<sup>I</sup>**

*Phytochemical Research Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.*

<sup>I</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>II</sup> Laboratory of Clinical Toxicology and Immunology, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

Address: Avenida Roraima, 1000, Prédio 26, sala 1107, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Phone: +55 55 99199080

\*E-mail: juliana.brondani@gmail.com

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of the hydroethanolic extract obtained from the leaves of *Dolichandra unguis-cati* in order to identify deleterious effects on cell integrity and genome. Validated methods were used to analyze the cell proliferation and viability, alkaline comet DNA and micronucleus frequency in human non-malignant cells, as well as to quantify phytochemicals groups. Total polyphenols, flavonoids and condensed tannins were quantified. The toxicological tests demonstrated that the plant does not pose genotoxic and mutagenic effects, but a cytotoxic activity was established in a dose-dependent manner. Our results indicate that the hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves is safe concerning genotoxic and mutagenic effects, while the cytotoxicity identified needs further investigations to set the safety in the use of this plant, as well as its potential as an anti-tumor agent.

**Keywords:** *Dolichandra unguis-cati*, Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, Chemical composition

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad del extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de *Dolichandra unguis-cati* con el fin de identificar los efectos nocivos sobre la integridad celular y el genoma. Métodos validados fueron utilizados para analizar la proliferación celular y viabilidad, el DNA cometa alcalino y la frecuencia de micronúcleos en células no malignas humanas, así como para cuantificar los grupos fitoquímicos. Polifenoles totales, flavonoides y taninos condensados fueron cuantificados. Las pruebas toxicológicas demostraron que la planta no presenta efectos genotóxicos y mutagénicos, pero una actividad citotóxica se estableció en una forma dependiente de la dosis. Nuestros resultados indican que el extracto hidroalcohólico de *Dolichandra unguis-cati* hojas es seguro en relación con los efectos genotóxicos y mutagénicos, mientras que la citotoxicidad identificado necesita más investigaciones para establecer la seguridad en el uso de esta planta, así como su potencial como un agente anti-tumor.

**Palabras clave:** *Dolichandra unguis-cati*, Citotoxicidad, Genotoxicidad, Mutagenicidad, Composición química

### 1. Introduction

The utilization of medicinal plants for the treatment of a variety of diseases constitutes an ancient practice dating back thousands of years. In the modern era, their lower cost relative to many pharmaceuticals, coupled with the belief that "natural remedies" do not pose a health hazard, compels people to choose phytotherapy over more conventional medical regimens (Diarra *et al.*, 2016). *Dolichandra unguis-cati*, popularly known as "unha-de-gato" is a climber plant belonging to the Bignoniaceae family. Commonly encountered in South America, as well as in Egypt and western India, this plant has been used for ornamental and medicinal purposes (Siqueira *et al.*, 2014; Lorenzi and Matos, 2008).

Some studies have demonstrated that its leaves are traditionally employed for the treatment of diarrhea, rheumatism, fever, snake bite, cancer, venereal diseases and inflammatory reactions (Aboutabl *et al.*, 2008; Lorenzi and Matos, 2008; Mors *et al.*, 2000. Duarte *et al.*, 2000). Phytochemical compounds identified in this plant are targets of pharmacological interest because of their capacity for the preservation and restoration of human health (Aboutabl *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2000). However, little is known about the toxicological profile of *D. unguis-cati* and the negative effects that may be experienced by the organism. According to the literature, the compounds present in some plant extracts may induce cell death and DNA damage (Yedjou *et al.*, 2016). Therefore, the aim of this study was to demonstrate the safety in the use of the hydroalcoholic crude extract obtained from the leaves of *D. unguis-cati* (CELD) through the assessment of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Botanical material and extraction procedure

Leaf samples of *D. unguis-cati* were collected in Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil), in October 2014 (coordinates 29°38'50,38242"S and 53°41'16,49497"W) and identified by Prof. R.A. Záchia. A voucher specimen was deposited in the herbarium of the Department of Biology at the Universidade Federal de Santa Maria, under register number SMDB 15442.

After drying in an air-circulating convection oven at 40°C, the *D. unguis-cati* leaves were powdered in a cutter mill and macerated in ethanol 70% in a dark room at ambient temperature for 21 days, stirring throughout. The macerate obtained was filtered and concentrated until ethanol complete elimination in a rotary evaporator Buchi RII. The extract was then lyophilized and stored under refrigeration.

### 2.2. Phytochemical Analysis

The quantification of total polyphenol, flavonoid and condensed tannin content present in *D. unguis-cati* leaves was determined through specific colorimetric reactions, conducted in triplicate following the methods described by George *et al.* (2005), Rio (1995) and Agostini-Costa *et al.* (1999), with slight modifications.

### 2.3. Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity evaluations against human leukocytes

All the experimental procedures utilized in this study were approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Pampa (nº 27045614.0.0000.5323). Humans leukocytes were chosen due to their sensitivity to xenobiotics. For all samples, 0.5 mL of venous blood collected by venipuncture from a male volunteer was added to RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicilin. The cells were maintained at 37°C with 5% of CO<sub>2</sub> until the moment of use. The positive control is represented by the addition of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 10µMol), while CELD was tested in three different concentrations: 1, 10 and 100 µg/mL.

#### 2.3.1. Cytotoxicity assay

As described by Burow *et al.* (1998), the effects on cell proliferation and viability were assessed by mixing the cell suspension with Trypan Blue, in triplicate, with subsequent microscopic observation (Olympus model CH-30, Tokyo, Japan; 400x magnification). The result is expressed by the average percentage obtained from dead or unviable cells within a total of 300 cells per slide.

#### 2.3.2. Genotoxicity assay

The alkaline comet DNA assay was conducted to evaluate the genotoxic activity of CELD, in triplicate, through single cell gel electrophoresis, as described by Singh *et al.* (1988). The electrophoretic analyses were carried out at 300mA and 25V, in a horizontal chamber (Thermo Fisher Science, Waltham, MA, USA) during 20 min and, subsequently, stained with silver. Each cell was classified according to their level of damage (from 0 to 4) and the sum of the damage values provided the DNA damage index (DI), which ranges between 0 (100 cells x 0) to 400 (100 cells x 4).

#### 2.3.3. Mutagenicity assay

Micronucleus frequency evaluation was performed in duplicate to determine the mutagenic effect of CELD. In this study, the treated cell cultures were adhered to glass microscope slides following the smear slide method, allowed to dry at room temperature and stained by Panotico Rapido (Labor Clean). The slides were then analyzed with oil immersion optical microscopy. Each result expressed a 1000 cell-count (Thomas *et al.*, 2008).

#### 2.4. Statistical analysis

The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni *post-hoc* test. The differences between groups were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Total phenolic, flavonoid and condensed tannin contents

The quantification of natural compounds presented in the CELD is summarized in Table 1. The contents were determined from extrapolation of the calibration curves:  $y = 0.0264x - 0.1057$ ;  $R^2 = 0.999$  (for total polyphenols),  $y = 0.0027x + 0.0235$ ;  $R^2 = 0.998$  (for flavonoids) and  $y = 0.0002 - 0.0092$ ;  $R^2 = 0.999$  (for condensed tannins).

**Table 1**  
Total phenolic, flavonoid and condensed tannin content of CELD

Phytochemical parameter	Quantification ( $\pm$ SD)
Total phenolic content (mg GAE g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	291.20 ( $\pm$ 0.028)
Total flavonoid content (mg RE g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	49.30 ( $\pm$ 0.033)
Condensed tannin content (mg CE g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	24.00 ( $\pm$ 0.002)

<sup>a</sup> Total phenolic content expressed as gallic acid equivalent (mg GAE g<sup>-1</sup> extract).

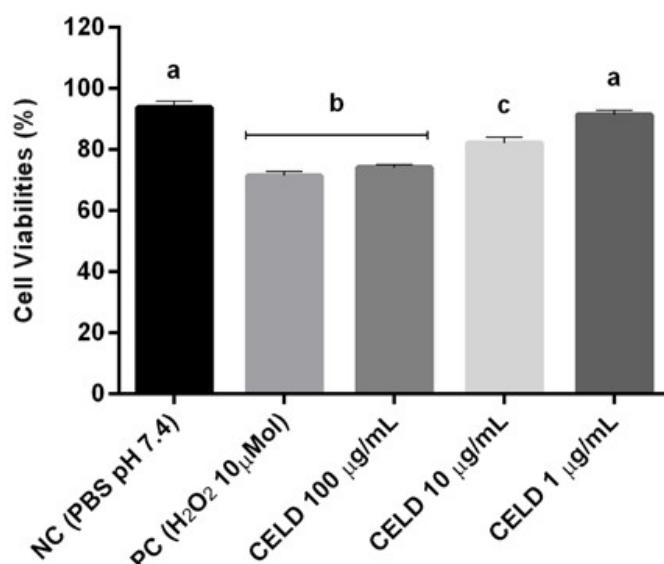
<sup>b</sup> Total flavonoid content expressed as rutin equivalent (mg RE g<sup>-1</sup> extract).

<sup>c</sup> Condensed tannin content expressed as catequin equivalent (mg CE g<sup>-1</sup> extract).

#### 3.2. Cytotoxicity evaluation

Acting as a positive control, hydrogen peroxide decreased the number of leukocytes and caused approximately 25% of cell viability reduction. Similarly, the highest concentration of CELD (100  $\mu$ g/mL) also exerted a damaging effect on leukocytes' viability. The intermediate concentration (10  $\mu$ g/mL) tested was statistically different from both, positive and negative controls. On the other hand, CELD in a concentration of 1  $\mu$ g/mL presented results in agreement with the negative control (Fig. 1).

**Figure 1**

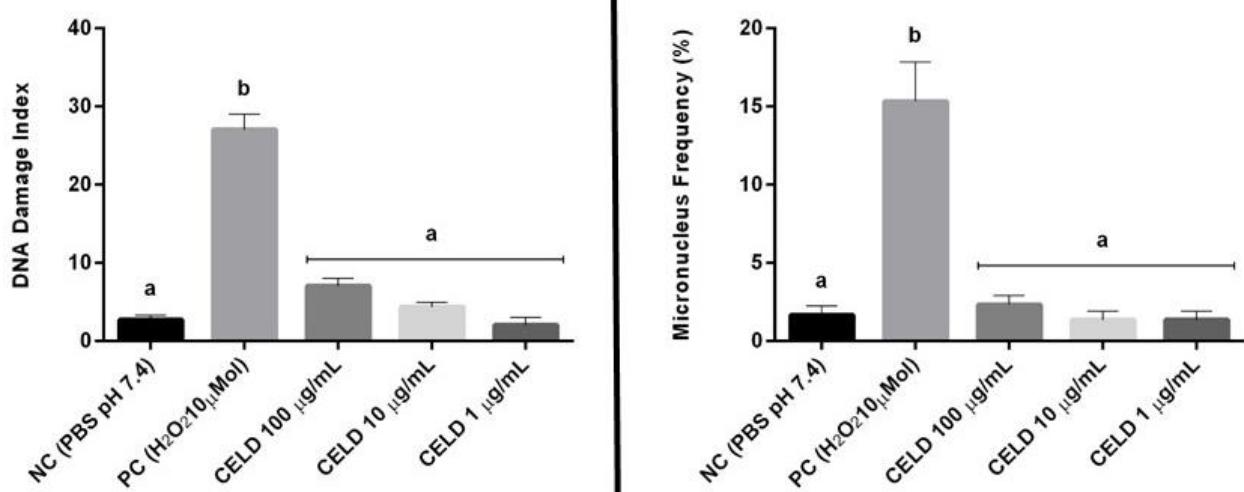


Graphical representation of CELD effects (1, 10 and 100  $\mu$ g/mL) on cell proliferation for evaluating the cytotoxicity. NC (negative control), PC (positive control), CELD (*D. unguis-cati* leaves hydroalcoholic crude extract). Bars with the same name letters indicate statistical similarity.

### 3.3. Genotoxicity and mutagenicity assays

As shown in figure 2, none of the CELD treatments (1, 10 and 100 µg/mL) caused significant DNA damage or emergence of micronucleus. All tested concentrations presented similar results to the negative control (PBS buffer), while the positive control (hydrogen peroxide) increased the DNA damage and the frequency of micronucleus by approximately 25% and 13%, respectively.

**Figure 2**



Graphical representation of CELD effects (1, 10 and 100 µg/mL) on DNA damage and micronucleus frequency for evaluating the genotoxicity and mutagenicity, respectively. NC (negative control), PC (positive control), CELD (*D. unguis-cati* leaves hydroalcoholic crude extract). Bars with the same name letters indicate statistical similarity.

### 4. Discussion

Phytotherapy is the oldest therapeutic modality in the treatment of human and animal diseases, and the first reports regarding the utilization of plants (fresh or in the form of extracts) for medicinal purposes date back many centuries (Tomazzoni *et al.*, 2006). Generally, herbal medicines are readily received by the population because of their low cost, easy access and perceived low-toxicity (Da Silveira *et al.*, 2008). However, epidemiologic and clinical evidence supports the hypotheses that phytochemicals can modulate the cellular metabolism and antioxidant enzyme expression, thus affecting the cell's integrity and redox status (Fernández-Pachón *et al.*, 2009).

As such, the biological safety of medicinal plants cannot be assumed, since some of its constituents may exert toxic effects and pro-oxidant activities (Nath and Yadav, 2015; Samec *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2014). The presence of oxidative conditions in the cell gives rise to reactive oxygen species (ROS), which may result in DNA functionalization and fragmentation. If this process is not properly repaired, changes to the genome may occur, leading some cells to keep proliferating with damaged DNA (Swift and Golsteyn, 2014; Furness *et al.*, 2011). In this context, the objective of the present study was to investigate, for the first time, the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of *Dolichandra unguis-cati* leaves.

Cytotoxicity is a crucial toxicological parameter that indicates alterations in cell proliferation and viability. This study enable us to identify dead or unviable non-malignant cells (e.g leukocytes) as a consequences of exposure to xenobiotics that may alter the stability of cell membranes. In this assay, we observed that the lowest CELD concentration (1 µg/mL) was absent of cytotoxicity to human leukocytes, being statistically similar to the negative control. On the other hand, the treatments with 10

and 100 µg/mL decreased cellular viability in a dose-dependent manner. It is worth noting that the highest tested dose presented cytotoxic results in accordance with the positive control. Since we have studied the crude extract of *D. unguis-cati*, the identified cytotoxic activity might be result of the synergistic interaction of the plant's many constituent natural products, rendering it impossible to state which compound(s) is(are) exerting a cytotoxic effect. However, literature reports indicate that phytochemical constituents of plant extracts, either acting individually or synergistically, can exert protective actions against oxidative damage on important biological substrates yet, at the same time, possess pro-oxidative effects against others (Dorman and Hiltunen, 2011; Banerjee *et al.*, 2008), which may explain the trends observed in leukocyte viability.

In the past years, studies have shown that different classes of polyphenols (including flavonoids and tannins) can act as both pro-oxidants and antioxidants, being able to induce an increase in intracellular ROS levels and lead to apoptosis, which is considered an important mechanism of their anticancer properties (Singh *et al.*, 2013). The CELD quantification of polyphenols that we performed, along with other studies of its chemical composition (Aboutabl *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2000), does not contraindicate the popular use of this plant as an antitumor agent. Nevertheless, despite its potential activity as an antitumor agent, it is important to highlight the fact that this activity was identified in non-malignant cells, showing a lack of specificity of the active constituents. Moreover, this action may not be maintained when tested against abnormal cell lines (e.g. tumor cells).

To access the genotoxic activity of CELD, the alkaline comet DNA assay was performed. This is an extremely sensitive method in a pre-clinical phase of study to detect simple and double breaks in DNA strands, which can be visualized in the electrophoresis by an increased migration of free DNA segments, resulting in comet-like streaks (Matic *et al.*, 2013). The micronucleus assay is an important indicator of DNA mutagenesis caused by xenobiotics that affords an accurate identification of possible clastogenic (chromosome breakage) and aneugenic (abnormal chromosome segregation) effects (Araldi *et al.*, 2015). In accordance with other studies (Dalla Lana *et al.*, 2015; Zuravski *et al.*, 2015), our results show that all concentrations of CELD did not present genotoxicity and mutagenesis when tested in human leukocytes, being considered safe in these aspects. This result is very important since the exposure to xenobiotics can result in covalent bond with DNA, resulting in genetic damage, which is recognized as a possible early event in the process of chemical carcinogenesis (Swift and Golsteyn, 2014).

## 5. Conclusion

The hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves did not present significant genotoxic and mutagenic effects, since no major alteration was found in the evaluations for DNA damage and micronuclei frequency. Moreover, the extract demonstrated cytotoxicity for human leukocytes, reducing cell viability in a dose-dependent manner. This fact does not discourage the use of this plant for medicinal purposes, but does highlight the need for further investigations regarding the safety and the potential anti-tumor properties of the active compounds.

## 6. References

- Aboutabl EA, Hashem FA, Sleem AA, Maamoon AA. 2008. Flavonoids, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Macfadyena uniguis-cati* L. Afr J Tradit Complement Altern Med 5(1): 18-26.
- Araldi RP, De Melo TC, Mendes TB, Junior PLS, Nozima BHN, Ito ET, De Carvalho RF, De Souza EB, Stocco RC. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. Biomed Pharmacother 72: 74-82.
- Banerjee A, Kunwar A, Mishra B, Priyadarsini KI. 2008. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. Chem Biol Interact 174(2): 134-139.

- Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, Hammond TG, Clejan S, Beckman BS. 1998. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res* 58(21): 4940-4946.
- Da Silva AR, Moreira LR, Brum ES, De Freitas ML, Boligon AA, Athayde ML, Roman SS, Mazzanti CM, Brandão R. 2014. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *J Ethnopharmacol* 153(3): 908-916.
- Da Silveira PF, Bandeira MAM, Arrais PSD. 2008. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Rev Bras Farmacogn* 18(4): 618-626.
- Dalla Lana DF, Donato RK, Bundchen C, Guez CM, Bergamo VZ, De Oliveira LFS, Machado MM, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015. Imiazonium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J Appl Microbiol* 119: 377-388.
- Diarra M, El Ouahabi H, Bouxid H, Boujraf S, Khabbal Y, Ajdi F. 2016. Medicinal Plants in Type 2 Diabetes: Therapeutic and Economical Aspects. *Int J Prev Med* 7:56.
- Dorman HJD, Hiltunen R. 2011. Antioxidant and pro-oxidant in vitro evaluation of water-soluble food-related botanical extracts. *Food Chem* 129(4): 1612-1618.
- Duarte DS, Dolabela MF, Salas CE, Rasian DS, Oliveiras AB, Nenninger A, Wiedemann B, Wagner H, Lombardi J, Lopes MT. 2000. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). *J Pharm Pharmacol* 52(3): 347-352.
- Furness DLF, Deffer GA, Roberts CT. 2011. DNA damage and health in pregnancy. *J Reprod Immunol* 89: 153-162.
- Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 53(5): 1370-1373.
- Lorenzi H., Matos FJA. 2008. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas, second ed. Plantarum, Nova Odessa.
- Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. 2000. Medicinal plants of Brazil, first ed. Reference Publications, Michigan.
- Nath P, Yadav AK. 2015. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the methanolic extract from leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* L. in mice. *J Intercult Ethnopharmacol* 4(1): 70-73.
- Rio RGW. 1996. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Matić S, Stanić S, Bogojević D, Vidaković M, Grdović N, Dinić S, Solujić S, Mladenović M, Stanković N, Mihailović M. 2013. Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutat Res* 755(2): 81-89.
- Šamec D, Gruž J, Durgo K, Kremer D, Kosalec I, Žulj LV, Martinez S, Salopek-Sondi B, Piljac-Žegarac J. 2015. Molecular and cellular approach in the study of antioxidant/pro-oxidant properties of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Nat Prod Res* 29(18): 1770-1774.
- Singh M, Bhui K, Singh R, Shuka Y. 2013. Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. *Life Sci* 93(1):7-16.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-191.
- Siqueira J, De Freitas EM, Périco E. 2014. Influência de reguladores de crescimento no cultivo in vitro de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann a partir de estacas caulinares. *IHERINGIA Ser Bot* 69(2): 341-346.
- Swift LH, Golsteyn RM. 2014. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci* 15(3): 3403-3431.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res* 638(1-2): 37-47.
- Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. 2006. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto contexto - enferm* 15(1): 115-121.
- Yedjou CG, Tchounwou PB, Miele L, Payton M. 2016. Natural plant extracts induced DNA damage and apoptosis through oxidative stress in transgenic mouse model. *Cancer Res* 76(14): 838-838.

Zuravski L, Coelho RP, Duarte JA, Rocha MO, Mezzomo J, Pilar BC, Galarça LL, Athayde ML, Boligon AA, Machado MM, Manfredini V. 2015. Protective role of golden flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) against oxidative damage in lipids and proteins of healthy volunteers. *J Biosci Med* 3(10): 45-53.

## 2.2 MANUSCRITO 2

### **EVALUATION OF ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY OF HYDROETHANOLIC EXTRACT OF *Dolichandra unguis-cati* L. LEAVES IN RATS**

O presente manuscrito foi submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*.

#### **Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats**

**Juliana Calil Brondani<sup>a,\*</sup>, Fernanda Ziegler Reginato<sup>b</sup>, Evelyne da Silva Brum<sup>c</sup>, Marina de Souza Vencato<sup>c</sup>, Cibele Lima Lhamas<sup>d</sup>, Carine Viana Silva<sup>a</sup>, Maria Izabel Ugalde Marques da Rocha<sup>c</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>b</sup>, Melânia Palermo Manfron<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Department of Histology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

\*Correspondence to: Avenida Roraima, 1000, Prédio 26, sala 1107, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone: +55 55 99199080. E-mail address: juliana.brondani@gmail.com

## ABSTRACT

*Ethnopharmacological relevance:* *Dolichandra unguis-cati* L. is a native climbing plant of Brazil, popularly known as “unha de gato”. It has been traditionally used mainly as an antipyretic, anti-inflammatory and anti-tumor agent, yet little toxicological information is found in the literature.

*Aim of the study:* To identify the chemical composition of the hydroethanolic extract obtained from the leaves of *Dolichandra unguis-cati* and to evaluate the acute and subacute toxicity in male and female rats, in order to assess the safety profile of this plant.

*Materials and methods:* In the acute study, a single dose (2000 mg/kg) of the extract was orally administered to male and female rats. In the subacute study, the extract was orally

administered to male and female rats at doses 100, 200 and 400 mg/kg for 28 days. Behavioral changes, catalase and lipid peroxidation determinations, biochemical, hematological and histopathological parameters were analyzed. *Artemia salina* was used as a lethality test. The extract' chemical composition was accessed through UHPLC/MS.

**Results:** Chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, ferulic acid, vanilinic acid, p-coumaric acid, rosmarinic acid, *trans*-cinnamic acid, luteolin, apigenin, quercitrin and quercetin were identified in the extract. In the acute treatment, the extract was classified as safe (category 5), according to the Organization for Economic Cooperation and Development guideline. In relation to the subacute study, females showed a reduction in aspartate aminotransferase (100, 200 and 400 mg/kg), alanine aminotransferase (200 mg/kg) and blood urea nitrogen (100 and 200 mg/kg) levels. Both genders presented a reduction in the cholesterol dosage at all doses and male rats 400 mg/kg presented an increase in aspartate aminotransferase levels. No behavioral and histopathological changes were recorded.

**Conclusions:** Our results indicate that the hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves did not present relevant toxic effects when administered orally to male and female rats. The extract also showed potential hepatoprotective and hypocholesterolemic activities.

**Keywords:** *Dolichandra unguis-cati*, Acute toxicity, Subacute toxicity, UHPLC/MS.

Chemical compounds studied in this article

Chlorogenic acid (PubChem CID: 1794427); Vanilinic acid (PubChem CID: 8468); Caffeic acid (PubChem CID: 689043); p-coumaric acid (PubChem CID: 637542); Ferulic acid (PubChem CID: 445858); Rutin (PubChem CID: 5280805); Rosmarinic acid (PubChem CID: 5281792); Quercitrin (PubChem CID: 5280459); Trans-cinnamic acid (PubChem CID: 444539); Quercetin (PubChem CID: 5280343); Luteolin (PubChem CID: 5280445); Apigenin (PubChem CID: 5280443).

## 1. Introduction

Since ancient times, humans have sought to find remedies for their ailments in nature. Specifically, natural products and their synthetic derivatives have been discovered from the huge diversity of plants in the world, in order to prevent and treat many of humanity's maladies (Kakooza-Mwesige, 2015).

Medicinal plants are commonly used as therapeutic agents because they represent an efficient, inexpensive alternative to traditional medicine, that are generally considered safe (Rokaya *et al.*, 2014). However, it represents a misconception, since their action may cause side effects. Moreover, several herbal medicines are used indiscriminately, without a prescription or appropriate instruction, thereby representing a potential risk to the population. In spite of their traditional uses, evaluation of the toxicological profiles of medicinal plants is important to ensure safety for the user population (Bello *et al.*, 2016; Da Silveira *et al.*, 2008).

*Dolichandra unguis-cati* belongs to the Bignoniaceae family, being a native climbing plant from north to south of Brazil, which is also found in other parts of South America, as well as Egypt and western India. Popularly known as "unha-de-gato", "cipó-de-morcego" and "cipó-de-gato", *D. unguis-cati* have various uses, ranging from ornamental to therapeutic purposes (Siqueira *et al.*, 2014; Lorenzi and Matos, 2008). In folk medicine, ethnopharmacological records show that the leaves are used for the treatment of snake bite, diarrhea, fever, rheumatism, inflammatory reactions and to induce diuresis. Its tuber and root nodules are utilized for the treatment of hepatitis (Aboutabl *et al.*, 2008; Houghton and Osibogun, 1993). Moreover, previous data reported its uses against venereal diseases and malaria (Lorenzi and Matos, 2008; Mors *et al.*, 2000). Anti-tumor and anti-trypanosome properties were also reported in the literature (Duarte *et al.*, 2000).

Many bioactive substances have been isolated from *D. unguis-cati*. These include corimboside, vicenin-2, O-flavonol, quercetin, chlorogenic acid, isochlorogenic acid, lupeol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterilglycoside, allantoin, lapachol, among others (Aboutabl *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2000). The great potential of *D. unguis-cati* as an herbal medicine is further supported by its biological and pharmacological applications described in the literature. However, there is insufficient data demonstrating the safety of the crude extract from the leaves of *D. unguis-cati* (CELD). Therefore, the aim of this study was to investigate the toxicity of *D. unguis-cati* using *in vitro* and *in vivo* experimental models.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Fresh leaves of *Dolichandra unguis-cati* were collected in Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) in October 2014 (coordinates 29°38'50,38242"S and 53°41'16,49497"W). The plant was identified and authenticated by Prof. R.A. Záchia, and a voucher specimen (No. SMDB 15442) was deposited in the herbarium of the Department of Biology at Universidade Federal de Santa Maria.

### 2.2. Obtention of extract

*Dolichandra unguis-cati* leaves were dried in a circulating air oven, then powdered in a knife mill. The powder was macerated with ethanol 70% at room temperature for 21 days, using a daily shake-up. After this period, the macerate was filtered and concentrated in a rotary evaporator Buchi RII. Finally, the extract was lyophilized and stored under refrigeration.

### 2.3. Chemicals and reagents

All chemicals were of analytical grade. Gallic acid, chlorogenic acid, (+)-catechin, vanillic acid, 6-hydroxycoumarin, p-coumaric acid, rutin, 4-hydroxycoumarin, rosmarinic acid, quercitrin, myricetin, fisetin, resveratrol, trans-cinnamic acid, quercetin, luteolin, apigenin, kaempferol, 3-6 dihydroxyflavone, chrysins, galangin, 3-acetyl coumarin and acetic acid were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Caffeic and ferulic acids were purchased from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). Acetonitrile and methanol were supplied by Panreac (Castellar del Vallès, Spain). The stock solutions of the phenolic standards were prepared by dissolution of appropriate amounts of substances in methanol.

The ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) system.

### 2.4. Phytochemical characterization: UHPLC/MS

According to Faccin *et al.* (2016), chromatographic analyses of polyphenols were performed using an UHPLC 1260 Infinity Binary system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) able to operate at pressures up to 600 bar. The separations were carried out under gradient conditions with a Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD column (2.1mm x 50 mm, with 1.8  $\mu$ m particle size, Agilent) at a temperature of 40°C. The mobile phase was water containing 0.1% acetic acid (A) and acetonitrile (B), according to the following elution program: 8.0% B (0.00–0.10 min); 8.0–25.8% B (0.10–3.45 min); 25.8–54.0% B (3.45–6.90 min); 54.0–100.0% B (6.90–7.00 min); and 100.0% B (7.00–9.00 min). The flow rate was 0.8 mL/min, the

injection volume was 5 uL and the injected aliquots were acidified to a final concentration of 0.1% acetic acid (v/v).

Mass spectrometry analysis was carried out using an Agilent 6430 triple quadrupole mass spectrometer. The instrument was operated using electrospray (ESI) ionization in a multiple reaction monitoring (MRM) mode, with a resolution of 0.7 m/z (FWHM). The collision energies and the transitions monitored by the mass spectrometer were optimized for each analyte. The optimal analyte response, in terms of signal intensity and stability, was found to be a gas flow of 11 L/min, a nebulizer of 30 psi, a capillary voltage of  $\pm$  2.4 kV and a gas temperature of 250°C, with nitrogen used as the drying gas. After finishing the gradient program, a post-run time of 4.0 min was adopted for reequilibrating the system. The resulting data were analyzed through a MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis (version B.04.00, Build 4.0.479.0, Agilent Technologies, Inc., 2011).

## 2.5. Brine shrimp lethality test

The *in vitro* acute toxicity test was performed following a procedure by Meyer *et al.* (1982). *Artemia salina*'s eggs were placed in a tank containing artificial sea water (2.8% saline), aerated and maintained at a temperature of 25°C  $\pm$  2°C. After incubation for 48 hours, the eggs hatched yielding nauplii, which were collected using a Pasteur pipette and transferred to sample vials containing 5 mL of artificial sea water (15 nauplii in each vial). Six different concentrations of CELD were tested in triplicate (50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 µg/mL). The 15 nauplii composing the control group received just artificial sea water.. After 24 hours, the number of nauplii deaths was determined in terms of percentage. Using Microsoft Excel, the regression equation was determined from the plot of nauplii mortality percentage versus the log of concentration, which allowed for the calculation of the LC<sub>50</sub>.

## 2.6. Experimental animals

Wistar albino rats of both sexes and weighting 120-170 g were obtained from Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. All animals were acclimatized to standard local conditions for 7 days, then randomly distributed into different experimental groups. The animals were maintained in polypropylene cages with 40 X 33 X 16 cm of dimension at a temperature of 23  $\pm$  2°C, with a 12:12 h light/dark cycle and 45-55% of relative humidity. The rats had free access to commercial food pellets and clean drinking water. All experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA No. 7715120115).

The acute and subacute oral toxicities of *D. unguis-cati* in male and female Wistar rats were conducted in compliance to the OECD guidelines (Organization for Economic Cooperation and Development) numbers 423 and 407, respectively, with slight modifications.

## 2.7. Acute toxicity test

According to Guidance OECD 423 (2001), the CELD was administered in a single dose of 2000 mg/kg dissolved in distilled water by oral gavage in three rats fasted overnight of each gender (n=6), while the control groups for both sexes (n=6) received distilled water. After that, all animals were individually observed to monitor physical and behavioral alterations for 14 days, giving special attention to the first 30 minutes after exposure. Specifically, alterations such as mortality, salivation, lethargy, diarrhea, tremors and convulsions were considered. We were also attentive to changes in body weight, fur and skin, eyes and mucous membranes, respiratory and central nervous systems, as well as to alterations in general behavior patterns. The experiment was performed twice as indicated in

the aforementioned guidelines. At the end of the treatment, the animals were fasted overnight and anesthetized, followed by blood collection by cardiac puncture. After euthanasia, target organs were collected for subsequent analysis.

### 2.8. Subacute toxicity test

In compliance to the Guidance 407 (1995), twenty rats (per gender) were distributed equally into four groups, three of them receiving different dosages of CELD (100, 200 and 400 mg/kg, resuspended in distilled water) and a control group treated with distilled water, totaling 40 animals used in this experiment. The doses were decided according to previous studies by our research group (Da Silva, 2014). Through daily administration by gavage for 28 days, the animals were observed considering the same physical and behavioral changes recommended by the OECD 423, as cited at item 2.5. At the end of the treatment, the animals were fasted overnight and anesthetized, followed by the blood collection by cardiac puncture. After euthanasia, target organs were collected for subsequent analysis.

#### 2.8.1. Histopathology

After euthanasia, liver and kidney samples were removed, fixed in 10% buffered formalin and underwent a routine histological process for paraffin embedding and light microscopic examination. Sections (6 µm thick) were stained by hematoxylin and eosin (H.E) method. Blinded histological analysis was performed by a trained histologist.

### 2.9. Biochemical and Hematological analysis

The blood samples collected by cardiac puncture underwent evaluation of biochemical and hematological parameters. Regarding the biochemical analysis, tubes without anticoagulant were used and the blood was allowed to clot before centrifugation (4000 rpm for 10 min), in order to obtain the serum. A semi-automatic analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000) and commercially available test kits (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) were utilized for the assessment of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (Chol), creatinine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN).

For the hematological analysis, tubes with EDTA were used and the total blood was subject to the evaluation of red blood cells (RBC), hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), red blood cell distribution width (RDW), platelets (PTL), as well as the total (WBC) and differential counts of leukocytes, by using the automatic veterinary counter Mindray BC 2800.

### 2.10. Open Field test

One day prior to the euthanasia of animals, spontaneous exploratory behaviour was evaluated in the Open Field test by simultaneous measures of locomotion and exploration. This is a valuable investigation in order to identify signs of anxiety and/or motor disturbance, after exposure to CELD. The Open Field apparatus was constructed with plywood, measuring 45 X 45 cm, with 30 cm walls and the base was divided into nine squares with tape markers (3X3). Each rat was placed in the central square, being allowed to explore the apparatus for 5 minutes. During this time, we recorded the frequency of line crossing with all four paws and rearing on the hind legs. Between each test, the apparatus was cleaned with ethanol 70% (Choleris *et al.*, 2001).

## 2.11. Lipid peroxidation/*ex vivo* antioxidant activity of CELD

The liver and kidney lipid peroxidation (LPO) estimation was determined spectrophotometrically using TBARS method as described by Buege and Aust (1978). This experiment enabled us to quantify the colorimetric complex formed from the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with the LPO product malondialdehyde (MDA), in acid solution at 532 nm.

Catalase (CAT) antioxidant activity of liver and kidney was determined according to the method described by Aebi (1983). This test is based on the conversion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and molecular oxygen by CAT, resulting in a loss of absorbance at 240 nm.

## 2.12. Statistical analysis

The data are expressed as mean ± S.D. The results were analyzed using Student's t-test and by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey *post-hoc* test. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Dunn's were used as statistic tests when the requirements to perform a parametric test were not satisfied. The differences between groups were considered to be statistically significant when p < 0.05.

## 3. Results

### 3.1.UHPLC/MS analysis

The crude extract from the leaves of *Dolichandra unguis-cati* (CELD) was analyzed by UHPLC/MS. As indicated in Table 1, the extract contains chlorogenic acid, vanillinic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, rosmarinic acid, quercitrin, *trans*-cinnamic acid, quercetin, luteolin and apigenin.

**Table 1**

Compounds identified and quantified in CELD through UHPLC/MS

Peak	Retention time (min)	Quantification transition <sup>‡</sup>	Confirmation transition <sup>‡</sup>	Compound	Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ of plant)
1	0.81	353.1 > 191.1 (5)	-	chlorogenic acid	2826.9 ± 19.3
2	0.97	167.0 > 152.2 (10)	167.0 > 123.1 (8)	vanillic acid	36.5 ± 3.0
3	0.97	179.0 > 135.1 (10)	-	caffeic acid	193.5 ± 5.8
4	1.83	163.0 > 119.1 (9)	-	p-coumaric acid	16.4 ± 0.2
5	2.52	193.1 > 134.1 (9)	193.1 > 178.1 (7)	ferulic acid	16.7 ± 1.1
6	3.16	609.1 > 300.1 (31)	-	rutin	27.5 ± 1.9
7	3.68	359.1 > 161.0 (7)	359.1 > 197.1 (7)	rosmarinic acid	11.7 ± 1.2
8	3.71	447.1 > 301.1 (17)	-	quercitrin	0.9 ± 0.04
9	4.44	147.0 > 103.2 (5)	147.0 > 77.1 (15)	<i>trans</i> -cinnamic acid	7.4 ± 1.2
10	4.64	301.0 > 151.1 (17)	301.0 > 179.0 (15)	quercetin	< ILOQ

<b>11</b>	4.67	285.0 > 133.2 (27)	285.0 > 151.1 (27)	luteolin	16.9 ± 1.0
<b>12</b>	5.29	269.0 > 117.1 (29)	269.0 > 149.0 (20)	apigenin	3.1 ± 0.2

<sup>‡</sup>Collision energy (V) is given in brackets.

### 3.2. Bioactivity of CELD on *A. salina* larvae

*D. unguis-cati* presented an LC<sub>50</sub> of 3539.54 µg/mL and the percentage of mortality was dependent and directly proportional to the concentration tested. The least toxic concentration was also the smallest one (50 µg/mL) and caused just 13.33% of deaths, while 100, 500, 1000, 2000 and 5000 µg/mL presented approximately 20, 26.66, 33.33, 46.66 and 53.33% of mortality, respectively.

### 3.3. Acute toxicity test

The acute toxicity test revealed that oral administration of a single dose (2000 mg/kg) of CELD did not show any signs of morbidity or mortality in treated animals during the 14 days. The body weight gain of control and treated groups were similar. Moreover, no behavioral changes were detected in the Open Field test, along with no significant differences on CAT and TBARS evaluations (data not shown).

For both genders, biochemical parameters AST and ALT had a reduction in the groups treated with the CELD, while male rats showed an increase in the CRE levels, when compared to the control group. In the hematological analysis, we observed a reduction in the leukocytes levels of female rats. Moreover, we detected an increase in the neutrophils levels of male rats, while female rats presented a reduction in the same parameter, when compared to the control group (Table 2).

The values of RBC, HCT, HGB, MCHC, MVC, RDW, PLT, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils, Chol and BUN presented no significant alterations as compared to the control group, in both sexes (data not shown).

**Table 2**  
Parameters altered after acute administration of CELD 2000 mg/kg in rats

Sex	Blood dosages	Control	CELD 2000 mg/kg
<b>Male</b>	AST (U/L)	102.7 ± 9.698	91.79 ± 5.077 <sup>a</sup>
	ALT (U/L)	60.65 ± 7.567	34.20 ± 4.161 <sup>a</sup>
	CRE (mg/dL)	0.5250 ± 0.050	0.6200 ± 0.08367 <sup>a</sup>
	WBC (X10 <sup>3</sup> /µL)	12.875 ± 2933	11.660 ± 1324
	Neutrophils (%)	19.40 ± 2.074	24.20 ± 3.421 <sup>a</sup>
<b>Female</b>	AST (U/L)	95.45 ± 14.73	83.10 ± 5.855 <sup>a</sup>
	ALT (U/L)	43.48 ± 7.639	33.98 ± 4.321 <sup>a</sup>
	CRE (mg/dL)	0.5750 ± 0.1258	0.5400 ± 0.05477
	WBC (X10 <sup>3</sup> /µL)	12.280 ± 3658	8.960 ± 789.3 <sup>a</sup>
	Neutrophils (%)	25.80 ± 4.087	18.60 ± 1.342 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean ± S.D. Student T test/Mann-Whitney (n = 6). Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (CRE) and leukocytes (WBC). The values were considered to be significantly different when p < 0.05. (a) Different from the control

### 3.4. Subacute toxiciy test

Oral administration of CELD at doses of 100, 200 and 400 mg/kg during 28 days did not cause any sign of adverse effects and no deaths were recorded. The body weight for both genders exhibited a physiological trend. In addition, the treatment with *D. unguis-cati* did not result in significant changes in the Open Field, CAT and TBARS evaluations, when compared to the control group (data not shown).

Considering the biochemical parameters evaluated (Table 3), we observed that female rats presented a reduction in serum AST activity in all groups treated with CELD, and the serum ALT activity was reduced in rats receiving 200 mg/kg, when compared to the control group. Moreover, the dosage of total cholesterol in female rats decreased in the groups treated with 100, 200 and 400 mg/kg. The female rats also showed a reduction in BUN levels in animals receiving 100 and 200 mg/kg. The other biochemical results were not modified in female rats, while in male rats we observed a slight increase in the serum AST activity at a dose of 400 mg/kg, as well as a non statistically significant decrease in the levels of ALT and Chol in all groups when compared to the control group.

In relation to the hematological analysis (Tabela 4), male rats treated with 200 mg/kg presented a slight reduction in the measurements of RBC, HGB and HCT. Moreover, the group treated at a dose of 100 mg/kg also showed decreased levels of RBC. For female rats, a reduction in the neutrophil level was observed in the animals receiving 200 mg/kg.

**Table 3**

Effects of subacute administration of CELD (100, 200 and 400 mg/kg) for 28 days on biochemical parameters in rats

Sex	Biochemical parameters	Study group		
		Control	100 mg/kg	200 mg/kg
<b>Male</b>	AST (U/L)	75.10 ± 7.528	82.13 ± 6.789	85.93 ± 5.427
	ALT (U/L)	64.10 ± 10.53	62.76 ± 11.32	52.53 ± 3.513
	CRE (mg/dL)	0.720 ± 0.04472	0.740 ± 0.1342	0.680 ± 0.08367
	BUN (mg/dL)	45.40 ± 7.570	46.00 ± 10.71	54.50 ± 4.041
	Chol (mg/dL)	129.40 ± 20.04	105.00 ± 6.325	116.40 ± 12.70
<b>Female</b>	AST (U/L)	123.3 ± 8.702	104.9 ± 8.521 <sup>a</sup>	99.94 ± 9.382 <sup>a</sup>
	ALT (U/L)	47.58 ± 4.730	45.60 ± 5.415	35.62 ± 6.421 <sup>a</sup>
	CRE (mg/dL)	0.460 ± 0.05477	0.520 ± 0.08367	0.540 ± 0.05477
	BUN (mg/dL)	47.00 ± 5.339	31.20 ± 5.357 <sup>a</sup>	35.80 ± 4.438 <sup>a</sup>
	Chol (mg/dL)	128.4 ± 8.444	98.60 ± 10.06 <sup>a</sup>	97.60 ± 5.128 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n = 5). Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN) and total cholesterol (Chol). The values were considered to be significantly different when p < 0.05. (a) Different from the control.

**Table 4**

Effects of subacute administration of CELD (100, 200 and 400 mg/kg) for 28 days on hematological parameters in rats

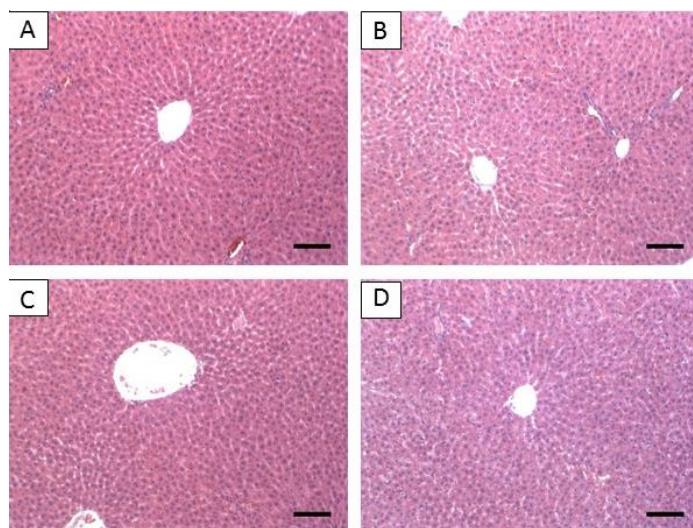
Sex	Hematological parameters	Study group		
		Control	100 mg/kg	200 mg/kg
<b>Male</b>	RBC (X10 <sup>6</sup> /µL)	8.614 ± 0.1926	7.914 ± 0.3926 <sup>a</sup>	7.684 ± 0.2256 <sup>a</sup>
	HGB (g/dL)	16.96 ± 0.3209	16.10 ± 0.8337	15.38 ± 0.8075 <sup>a</sup>
	HCT (%)	50.80 ± 1.304	48.40 ± 2.608	46.40 ± 2.408 <sup>a</sup>
	MCV (fL)	58.48 ± 2.252	59.80 ± 2.434	59.26 ± 2.935
	MCHC (g/dL)	33.40 ± 0.4301	33.20 ± 0.3742	33.60 ± 0.6964
	RDW (%)	15.74 ± 0.3362	15.68 ± 0.7155	15.48 ± 0.6301

	PLT (X10 <sup>3</sup> /µL)	1192 ± 200.5	1076 ± 179.6	1194 ± 240.6	1072 ± 122.6
	WBC (X10 <sup>3</sup> /µL)	12.300 ± 3101	13.925 ± 2293	12.440 ± 2257	12.680 ± 3362
	Lymphocytes (%)	70.20 ± 5.675	69.00 ± 5.148	69.80 ± 5.070	72.20 ± 8.786
	Neutrophils (%)	21.80 ± 4.817	23.00 ± 4.899	23.20 ± 5.263	22.80 ± 5.718
	Monocytes (%)	5.60 ± 0.8944	6.60 ± 2.074	5.80 ± 0.8367	6.00 ± 1.00
	Eosinophils (%)	2.00 ± 1.414	1.40 ± 1.342	2.60 ± 1.140	1.00 ± 1.225
	Basophils (%)	0.40 ± 0.5477	0 ± 0	0.20 ± 0.4472	0 ± 0
<b>Female</b>	RBC (X10 <sup>6</sup> /µL)	7.350 ± 0.3101	7.820 ± 0.3633	7.758 ± 0.2266	7.416 ± 0.1781
	HGB (g/dL)	14.56 ± 0.3647	15.30 ± 0.6325	15.24 ± 0.5771	14.80 ± 0.4743
	HCT (%)	46.40 ± 0.8944	45.80 ± 1.483	45.80 ± 1.643	44.20 ± 1.304
	MCV (fL)	57.38 ± 2.033	58.20 ± 2.417	57.66 ± 2.621	57.74 ± 1.350
	MCHC (g/dL)	34.26 ± 0.9290	33.64 ± 0.4336	33.78 ± 0.6723	34.56 ± 0.8706
	RDW (%)	14.72 ± 0.6611	13.96 ± 0.8444	13.54 ± 1.009	14.28 ± 0.5070
	PLT (X10 <sup>3</sup> /µL)	1258 ± 226.7	1122 ± 8.989	1243 ± 218.5	1043 ± 181.9
	WBC (X10 <sup>3</sup> /µL)	11.260 ± 1872	11.675 ± 2175	9.100 ± 1160	9.860 ± 2475
	Lymphocytes (%)	69.00 ± 5.244	71.00 ± 5.292	74.60 ± 1.517	70.40 ± 5.595
	Neutrophils (%)	25.40 ± 5.177	22.40 ± 2.608	18.60 ± 1.342 <sup>a</sup>	21.40 ± 4.506
	Monocytes (%)	6.40 ± 1.517	6.40 ± 2.191	5.80 ± 0.8367	6.40 ± 1.517
	Eosinophils (%)	1.40 ± 1.140	1.60 ± 1.817	1.00 ± 0.7071	1.80 ± 0.8367
	Basophils (%)	0.40 ± 0.5477	0.20 ± 0.4472	0 ± 0	0 ± 0

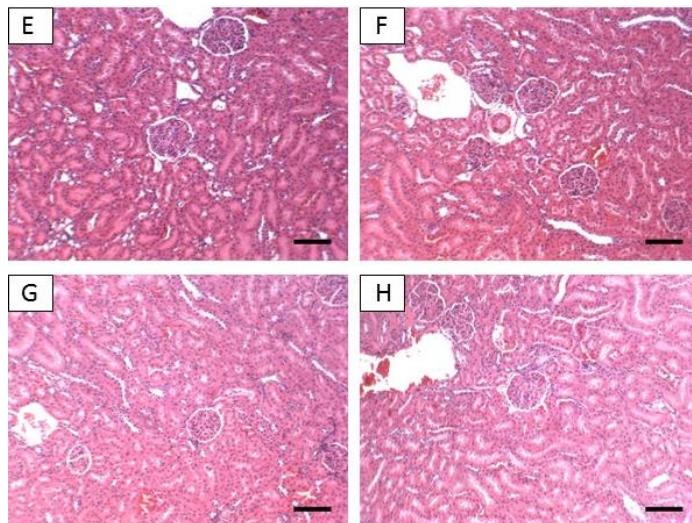
Data are expressed as mean ± S.D.. One way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n = 5). Red blood cells counts (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cells distribution width (RDW), platelets (PLT) and leukocytes (WBC). The values were considered to be significantly different when p < 0.05. (a) Different from the control.

### 3.5.Histopathology

Histopathological analysis of liver and kidney were performed in male and female rats exposed to the subacute treatment with CELD at different doses (100, 200 and 400 mg/kg), as well as in rats from the control groups. As represented in Figures 1 and 2, the results did not reveal any significative alterations and the tissues maintained their physiological aspect.



**Fig. 1.** Photomicrography of liver section from male rats of experimental control (A) and 400 mg/kg treated-group (B); Photomicrography of liver section from female rats of experimental control (C) and 400 mg/kg treated-group (D) of subacute toxicity test exhibiting hepatocyte strings, the centriolobular vein and sinusoid capillaries with physiological aspect. Size bar for comparison 10  $\mu$ m. H and E (x 100).



**Fig.2.** Photomicrography of kidney section from male rats of experimental control (E) and 400 mg/kg treated-group (F); Photomicrography of kidney section from female rats of experimental control (G) and 400 mg/kg treated-group (H) of subacute toxicity test showing physiological glomerulus, with preserved architecture of renal and proximal tubules. Size bar for comparison 10  $\mu$ m. H and E (x 100).

#### 4. Discussion

The traditional uses of plants in the treatment or management of a variety of diseases is plagued by a lack of information regarding the biological and side effects associated with these therapies (Park *et al.*, 2010). Based on this, we assessed the toxicological profile of CELD through *in vitro* and *in vivo* evaluations, relating it to the chemical composition identified.

The lethality test through *Artemia salina* larvae showed that *D. unguis-cati* had an LC<sub>50</sub> of 3539.54  $\mu$ g/mL, being considered to be non toxic. Utilizing the same protocol, a previous work identified plants moderately, weakly and non toxic. (Nguta and Mbaria, 2013). In the acute toxicity experiment, the oral administration of a single dose of CELD (2000 mg/kg) did not cause mortality, or behavioral and body weight changes. According to OECD 423, since all animals survived until their scheduled euthanasia, the extract has low toxicity and should be included in category 5, with a LD<sub>50</sub> estimated between 2000-5000 mg/kg. The subacute toxicity study, involving the orally administration of CELD at doses of 100, 200 and 400 mg/kg, did not present alterations in animals behavior, body weight and mortality. Moreover, the histopathological examination of the subacute study, showed that the extract did not cause liver and kidney damage, which corroborates the claim of the plant extract to be non-toxic.

Liver is the main organ responsible for the biotransformation of xenobiotics in the organism and, therefore, is one of the major targets of the adverse effects caused by toxic substances. The serum enzymes AST and ALT are considered sensitive markers of hepatocellular toxicity and its increased activity indicate liver damage (Ramaiah, 2011). In this work, we observed that an acute treatment with CELD caused a reduction in the activity of

AST and ALT for both genders. The sub-acute treatment decreased AST (100, 200 and 400 mg/kg) and ALT (200 mg/kg) in females rats, while male rats presented a non statistically significant reduction in ALT, suggesting that *D. unguis-cati* have a lack of hepatotoxicity and may have some hepatoprotective properties. The slight increase in the AST activity in male rats (400 mg/kg) remains within the physiological limits and does not indicate toxicity. Other studies reported similar findings regarding hepatoprotective effect of plants (Adewale *et al.*, 2016; Amenya *et al.*, 2014; Luka *et al.*, 2014). The hepatoprotective activity can be justified by the chemical composition identified by UHPLC/MS, since rutin, luteolin, p-coumaric acid and vanilinic acid are known as liver protectors. Moreover, chlorogenic acid, caffeic acid and apigenin were proved to have synergistic hepatoprotective effect (Ali *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2013).

Urea and creatinine are considered to be effective markers of kidney function and the increase of these parameters may be associated with renal damage (Gowda *et al.*, 2010). The results of this work suggest that CELD does not exhibit nephrotoxicity, since the dosage of BUN decreased in females subjected to sub-acute treatment (100 and 200 mg/kg). The increase of CRE for males of the acute experiment does not indicate kidney dysfunction, since the value is set within the physiological limits (Lima *et al.*, 2014) and is not accompanied by alterations in BUN levels.

The relationship between dyslipidemia and the development of chronic diseases such as diabetes and hypertension is well established (Halpern *et al.*, 2010). In our study, the prolonged administration of CELD showed a reduction in total cholesterol in both sexes, although in males the decrease was not statistically significant. This result suggests that *D. unguis-cati* can be useful in the prevention and treatment of hyperlipidemia and its consequences. Chlorogenic acid, the most abundant chemical constituent found in the extract, has already been associated with a hypocholesterolemic action through different mechanisms, like the activation of AMPK (Zheng *et al.*, 2014; Ong *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2013), activation of PPAR $\alpha$  (Cho *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011) and inhibition of HMG-CoA reductase activity (Cho *et al.*, 2010; Karthikesan *et al.*, 2010). Furthermore, the reduction in antioxidant defense mechanisms of the body, as well as increased membrane lipid peroxidation can result in oxidative stress, which also favors the development of chronic diseases (Matsuda and Shimomura, 2013). In this study, we observed that CELD did not reduce the measures of CAT neither increased the TBARS evaluation, suggesting that *D. unguis-cati* does not contributes to oxidative stress.

Since blood is the main carrier of substances in the body, its components are very sensitive to toxins and, so, hematological parameters represent an important clinical response to toxic compounds (Olson *et al.*, 2000). In our experiments, all the differences reported were within physiological limits found in the literature (Lima *et al.*, 2014) and possibly represent idiosyncrasies and individual variations in animals, not being associated with a toxic effect of the extract.

## 5. Conclusion

Our results demonstrate that the hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves did not present significant toxic effects when administered orally to male and female rats. It can be deduced from the fact that acute and subacute treatments did not cause death or relevant adverse alterations to the rats' biochemical, hematological and histopathological parameters. Furthermore, the extract showed potential hepatoprotective and hypocholesterolemic activities and may have biopharmaceutical applications.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of CAPES/Brazil and Bioclin/Quibasa for the donation of commercial kits.

## References

- Aboutabl, E.A., Hashem, F.A., Sleem, A.A., Maamoon, A.A., 2008. Flavonoids, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Macfadyena unguis-cati* L. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 5(1), 18-26.
- Adewale, O.B., Onasanya, A., Anadozie, S.O., Abu, M.F., Akintan, I.A., Ogbole, C.J., Olayide, I.I., Afolabi, O.B., Jaiyesimi, K.F., Ajiboye, B.O., Fadaka, A.O., 2016. Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extract of *Crassocephalum rubens* leaves in rats. J. Ethnopharmacol. 188, 153-158.
- Aebi, H.E., 1983. Methods of Enzymatic Analysis, third ed. Academic Press, New York.
- Ali, F.T., Hassan, N.S., Abdrabou, R.R., 2016. Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. Int. J. Res. Med. Sci. 4(4), 1147-1153.
- Amenya, H.Z., Gathumbi, P.K., Mbaria, J.M., Thaiyah, A.G., Thoithi, G.N., 2014. Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. J. Ethnopharmacol. 154, 593-599.
- Bello, I., Bakkouri, A.S., Tabana, Y.M., Al-Hindi, B., Al-Mansoub, M.A., Mahmud, R., Asmawi, M.Z., 2016. Acute and sub-acute toxicity evaluation of the methanolic extract of *Alstonia scholaris* stem bark. Med. Sci, <http://dx.doi.org/10.3390/medsci4010004>.
- Buege, S.C., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302–310.
- Cho, A.S., Jeon, S.M., Kim, M.J., Yeo, J., Seo, K.I., Choi, M.S., Lee, M.K., 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. Food Chem. Toxicol. 48(3), 937-943.
- Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M., Prato, F.S., 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. Neurosci. Biobehav. Rev. 25(3), 235-260.
- Da Silva, A.R.H., Moreira, L.R., Brum, E.S., De Freitas, M.L., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Roman, S.S., Mazzanti, C.M., Brandao, R., 2014. Biochemical and haematological effects of acute and subacute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. J. Ethnopharmacol. 153, 908-16.
- Da Silveira, P.F., Bandeira, M.A.M., Arrais P.S.D., 2008. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. Braz. J. Pharmacogn. 18(4), 618-626.
- Duarte, D.S., Dolabela, M.F., Salas, C.E., Rasian, D.S., Oliveiras, A.B., Nenninger, A., Wiedemann, B., Wagner, H., Lombardi, J., Lopes, M.T., 2000. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). J. Pharm. Pharmacol. 52(3), 347-352.
- Faccin, H., Viana, C., Do Nascimento, P.C., Bohrer, D., De Carvalho, L.M., 2016. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1427, 111-124.
- Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V.V., Math, A.A., Vernekar, S.N., 2010. Markers of renal function tests. N. Am. J. Med. Sci. 2(4), 170–173.
- Halpern, A., Mancini, M.C., Magalhães, M.E., Fisberg, M., Radominski, R., Bertolami, M.C., Bertolami, A., De Melo, M.E., Zanella, M.T., Queiroz, M.S., Nery, M., 2010. Metabolic

- syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2,55.
- Houghton, P.J., Osibogun, L.M., 1993. Flowering plants used against snakebite. *J. Ethnopharmacol.* 39, 1-29.
- Kakooza-Mwesige, A., 2015. The importance of botanical treatments in traditional societies and challenges in developing countries. *Epilepsy Behav.* 52, 297-307.
- Karthikesan, K., Pari, L., Menon, V.P., 2010. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chem. Biol. Interact.* 188(3), 643-650.
- Lima, C.M., Lima, A.K., Melo, M.G.D., Doria, G.A.A., Leite, B.L.S., Serafini, M.R., Albuquerque-Junior, R.L.C., Araujo, A.A.S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 10(3), 1-9.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2008. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas, second ed. *Plantarum*, Nova Odessa.
- Luka, J., Badau, S.J., Mbaya, A.W., Gadzama, J.J., Kumshe, H.A., 2014. Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28 days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* Hochst (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats. *J. Ethnopharmacol.* 153(1), 268-273.
- Matsuda, M., Shimomura, I., 2013. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes. Res. Clin. Pract.* 7, e330-e341.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45(5), 31-34.
- Mors, W.B., Rizzini, C.T., Pereira, N.A., 2000. Medicinal plants of Brazil, first ed. Reference Publications, Michigan.
- Nguta, J.M., Mbaria, J.M., 2013. Brine shrimp toxicity and antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Msambweni district of Kenya. *J. Ethnopharmacol.* 148,988-992.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A., 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(1), 56-67.
- Ong, K.W., Hsu, A., Tan, B.K., 2013. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochem. Pharmacol.* 85(9), 1341-1351.
- Organization for economic cooperation and development (OECD), 1995. Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. 468 adopted by the council on 27th, july 1995.
- Organization for economic cooperation and development (OECD), 2001. Guideline 423. Acute oral toxicity- acute toxic class method. 470 adopted by the council on 17th, december 2001.
- Park, M.Y., Choi, H.Y., Kim, J.D., Lee, H.S., Ku, S.K., 2010. 28 days repeated oral dose toxicity test of aqueous extracts of Mahwangyounpae teng, a polyherbal formula. *Food Chem. Toxicol.* 48(8-9), 2477-2482.
- Peng, C.H., Liu, L.K., Chuang, C.M., Chyau, C.C., Huang, C.N., Wang, C.J., 2011. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J. Agric. Food Chem.* 59(6), 2663-2671.

- Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I.C., 2016. Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. *J. Sci. Food Agric.* 96(4), 1068–1084.
- Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin. Lab. Med.* 31(1), 161-172.
- Rokaya, M.B., Upadhyay, Y., Poudel, R.C., Timsina, B., Munzbergova, Z., Asselin, H., Tiwari, A., Shrestha, S.S., Sigdel, S.R., 2014. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. *J. Ethnopharmacol.* 158, 221-229.
- Shi, H., Dong, L., Jiang, J., Zhao, J., Zhao, G., Dang, X., Lu, X., Jia, M., 2013. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology.* 303, 107-114.
- Siqueira, J., De Freitas, E.M., Perico, E., 2014. Influência de reguladores de crescimento no cultivo in vitro de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann a partir de estacas caulinares. *Iheringia Serie Botanica.* 69(2), 341-346.
- Wan, C.W., Wong, C.N., Pin, W.K., Wong, M.H., Kwok, C.Y., Chan, R.Y., Yu, P.H., Chan, S.W., 2013. Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- $\alpha$  in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytother. Res.* 27(4), 545-551..
- Zhao, J., Zhang, Z., Dai, J., Wang, L., Zhang, C., Ye, Y., Li, L., 2014. Synergistic protective effect of chlorogenic acid, apigenin and caffeic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in male mice. *RSC Adv.* 4, 43057-43063.
- Zheng, G., Qiu, Y., Zhang, Q.F., Li, D., 2014. Chlorogenic acid and caffeine in combination inhibit fat accumulation by regulating hepatic lipid metabolism-related enzymes in mice. *Br. J. Nutr.* 112, 1034-1040.

## 2.3 MANUSCRITO 3

### **THE PROTECTIVE EFFECT OF *Dolichandra unguis-cati* LEAVES IN MERCURY-INDUCED ACUTE TOXICITY IN RATS**

O presente manuscrito será submetido ao periódico *Environmental Science and Pollution Research*.

### **The protective effect of *Dolichandra unguis-cati* leaves in mercury-induced acute toxicity in rats**

**Juliana Calil Brondani<sup>a,\*</sup>, Camille Gaube Guex<sup>b</sup>, Fernanda Ziegler Reginato<sup>b</sup>, Ana Martiele Engelmann<sup>c</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>b</sup>, Melânia Palermo Manfron<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Morphology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

\*Correspondence to: Avenida Roraima, 1000, Prédio 26, sala 1107, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone: +55 55 99199080. E-mail address: juliana.brondani@gmail.com

## ABSTRACT

The intoxication by mercury is characterized by a severe oxidative stress that primarily affects liver and kidney. Natural compounds with antioxidant properties may then be used to minimize the deleterious effects of this metal. The present study was designed to investigate the protective effects of the crude extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD) in mercuric chloride ( $HgCl_2$ ) induced oxidative stress. Adult male Wistar rats were distributed in 4 groups. Group 1 (control); Group 2 received a single subcutaneous injection of  $HgCl_2$  at 5 mg/kg; Group 3 was orally treated with CELD (400 mg/kg) for 7 days and then subcutaneously injected a single dose of  $HgCl_2$  (5 mg/kg); Group 4 was orally given CELD (400 mg/kg) during 7 days. Biochemical, hematological and oxidative parameters were analyzed. The antioxidant properties were assessed by DPPH and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay. The pre-treatment with CELD was able to mitigate the toxic effects of  $HgCl_2$  decreasing the dosages of AST, ALT, BUN and CRE. The extract also improved the redox balance, reducing LPO and increasing the activity of SOD and CAT. Our results indicate that CELD may be a promissory agent in the prevention of acute intoxications by  $HgCl_2$ .

**Keywords:** *Dolichandra unguis-cati*, Mercuric chloride, Biochemistry, Hematology, Oxidative parameters, Antioxidant, Natural compounds

### 1. Introduction

Mercury is one of the most hazardous metals found in nature. Human exposure is hardly avoidable due to the ubiquitous presence of mercury as an environmental pollutant of air, water, food and soil, as well its widespread industrial use (thermometers, batteries, gold mining, lamps, amalgams) (Fu et al. 2013; Gupta et al. 2015). Acute intoxication from mercuric salts, typically mercury chloride ( $HgCl_2$ ), mainly targets the kidney and liver. Therein, mercury is readily accumulated, resulting in deleterious effects through the increased generation of free radicals, leading to oxidative stress (Uma et al. 2012; Othman 2014). As such, natural compounds exhibiting antioxidant properties have been suggested to inhibit  $HgCl_2$  induced toxicity (Gado and Aldahmash 2013).

*Dolichandra unguis-cati*, commonly known as "unha-de-gato", is a native climbing plant belonging to the Bignoniaceae family and found in South America, as well as in Egypt and western India. Widely used for ornamental and pharmacological purposes, this plant has been used in folk medicine to several ends, including the treatment of tumors, snake bite, fever, rheumatism, diarrhea and inflammatory reactions (Lorenzi and Matos 2008; Aboutabl et al. 2008; Siqueira et al. 2014). The biological actions reported are closely related to its chemical composition so far identified, which includes phenolic compounds with remarkable antioxidant properties (Pereira et al. 2016; Aboutabl et al. 2008; Duarte et al. 2000). Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity and the mitigating effect of the crude extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD) on the hepato- and nephro-toxicities induced by mercuric chloride.

### 2. Materials and methods

## 2.1. Plant material

Fresh leaves of *Dolichandra unguis-cati* were collected in Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) in October 2014 (coordinates 29°38'50,38242"S and 53°41'16,49497"W) and submitted to identification and authentication by Prof. R.A. Záchia. A voucher specimen (No. SMDB 15442) was deposited in the herbarium of the Department of Biology at Universidade Federal de Santa Maria. The leaves were dried in an air-circulating oven, powdered in a knife mill and, then, macerated with 70% ethanol at ambient temperature for 21 days, being shaken daily. At the end of this period, the macerate was filtered and concentrated in a rotary evaporator (Buchi RII), then lyophilized.

## 2.2. Chemical and reagents

Distilled water was used as solvent and all chemicals were of analytical grade. Methyl alcohol, chloroform, tween 40, ascorbic acid, epinephrine, HgCl<sub>2</sub>, β-carotene, linoleic acid, BHT and DPPH were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Folin ciocalteau, butyl alcohol, ethyl alcohol and hydrochloric acid were purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

## 2.3. Antioxidant capacity *in vitro*

### 2.3.1. Scavenging activity on DPPH

Radical scavenging activity of CELD against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical was determined spectrophotometrically following the method described by Choi et al (2002), with slight modifications. Basically, 2.5 mL of seven different concentrations of CELD (ranging from 3.125 µg/mL to 200 µg/mL) were added to 1 mL of DPPH 0.03 mM, in triplicate. The resulting mixtures were allowed standing in a dark room for 30 min. At the end of this period, the absorbance was measured at 518 nm and the percentage scavenging capacity (%SC) was determined following the equation:

$$\% SC = 100 - \left\{ \left[ (SA - BA) \div CA \right] \times 100 \right\}$$

SA = Sample absorbance (CELD or ascorbic acid: 3.125 µg/mL to 200 µg/mL);  
BA = Blank absorbance; CA = Control absorbance

Subsequently, the IC<sub>50</sub> was calculated from linear regression of the plots, where the abscissa represented the concentration of CELD/Ascorbic acid and the ordinate represented the average percent of scavenging capacity from three replicates. Ascorbic acid was used as a standard compound. The blank of each concentration was represented by 2.5 mL of CELD + 1 mL of ethanol. The negative control was composed by 2.5 mL of ethanol + 1 mL of DPPH 0.03 mM.

### 2.3.2. β-carotene/linoleic acid assay

The evaluation of the antioxidant activity through β-carotene/linoleic acid assay was determined spectrophotometrically, according to Mokbel and Hashinaga (2006), with slight modifications. In this test, an emulsion was prepared mixing 3.34 mg of β-carotene, 1 mL of chloroform, 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40, followed by the complete elimination of chloroform, via rotary evaporation, and resuspension of the residue with 5 mL of distilled water saturated with oxygen (100 mL of 0.01M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In triplicate, 100 µL of CELD (50 µg/mL) were added to 2 mL of the emulsion; the control was composed by 2 mL of emulsion and 100 µL of methanol; the blank received 100 µL of CELD

plus an emulsion without  $\beta$ -carotene; BHT (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a standard compound. The spectrophotometric measurement was carried out at 470 nm, using the blank to zeroing the spectrum. After the first reading, all tubes were kept at 50°C, and measured every 20 minutes, for 120 minutes. The  $\beta$ -carotene percentage of oxidation inhibition (%OI) was calculated according to the formula:

$$\%OI = \left\{ 1 - \left[ \frac{(SA(0) - SA(120))}{(CA(0) - CA(120))} \right] \right\} \times 100$$

SA = Sample absorbance (CELD or BHT at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); CA = Control absorbance; 0 = Initial absorbance; 120 = Last absorbance

#### 2.4. Animals and experimental protocol

Male Wistar albino rats ( $n=24$ ), weighting 180-200g were obtained from the Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. After an acclimatization period of one week, the animals were randomly distributed into 4 groups (6 rats per group) and housed in polypropylene cages with 40 X 33 X 16 cm of dimension at a temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , with 45-55% of relative humidity and a 12:12 h light/dark cycle. They were provided free access to clean drinking water and commercial food pellets. All experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA No. 7668030316).

In accordance with Oda and El-Ashmawy (2012), groups 1 (control) and 2 ( $\text{HgCl}_2$ ) were orally treated with distilled water for 7 days; Groups 3 (CELD+ $\text{HgCl}_2$ ) and 4 (CELD) were orally treated with CELD at 400 mg/kg during 7 days. On the 7<sup>th</sup> day, two hours after the respective administration by oral gavage, animals from group 1 and 4 subcutaneously received normal saline (0.9%), while the rats from group 2 and 3 got subcutaneous injections of  $\text{HgCl}_2$  (5 mg/kg) to induce acute liver and kidney failure. After 24 hours of subcutaneous treatments, the animals were euthanized after anesthesia and blood collection by cardiac puncture; target organs (liver and kidney) were subsequently removed for tissue analysis.

#### 2.5. Blood analysis

Biochemical and hematological parameters were determined in the blood collected by cardiac puncture. For the biochemical evaluation, the blood was allowed to clot in tubes without anticoagulant before centrifugation (4000 rpm for 10 min), in order to obtain the serum. Commercially available test kits (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and a semi-automatic analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000) were utilized for the assessment of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE). For the hematological analysis, tubes containing EDTA were used and the total blood obtained was subject to an automatic veterinary counter Mindray BC 2800 for the evaluation of red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PTL) and leukocytes' total (WBC) and differential counts.

#### 2.6. Oxidative stress/Antioxidant status *in vivo*

After euthanasia, liver and kidney samples were washed and homogenised in cold physiological saline, followed by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. The supernatants were separated and stored at -80°C until their convenient use in the spectrophotometric subsequent tests.

##### 2.6.1. Lipid peroxidation

As described by Buege and Aust (1978), TBARS method was used to access the lipid peroxidation (LPO) estimation. To perform this test, 250 µL of liver or kidney samples, 750 µL of trichloroacetic acid 10%, 500 µL of thiobarbituric acid 0.67% and 250 µL of distilled water were incubated for 15 minutes at 100°C. Posteriorly, 1.5 mL of n-butyl alcohol were added in order to extract the apolar product from the aqueous solution. The sample were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and the supernatants were analyzed at 535 nm.

#### 2.6.2. Antioxidant enzymatic determinations

Following the method of Sun and Zigman (1978), superoxide dismutase (SOD) activity was determined by its ability to inhibit the autoxidation of epinephrine, which is detected at 480 nm. Briefly, 2.95 mL of sodium carbonate buffer (0.05M) pH 10.2 were mixed with 0.02 mL of liver or kidney homogenates and 0.03 mL of epinephrine in hydrochloric acid 0.005N. Readings were taken every 15 seconds, in a total of 60 seconds.

Catalase (CAT) activity was measured as the rate constant of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) decomposition, resulting in a loss of absorbance at 240 nm (Aebi 1983). The reaction mixture contained 40 µL of liver or kidney homogenates, 2.86 mL of TFK and 105 µL of  $H_2O_2$ . Readings were taken every 15 seconds, in a total of 60 seconds.

#### 2.7. Statistical analysis

The data are expressed as mean ± S.D. The results were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey *post-hoc* test. The differences between groups were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Antioxidant capacity *in vitro*

The antioxidant activities of different concentrations of CELD and ascorbic acid (AA) in terms of DPPH scavenging capacity (SC) are displayed in Table 1. Acting as a standard compound, ascorbic acid predictably presented remarkable antioxidant capacity, showing SC percentages above 90% from the concentration of 12.5 µg/mL. The CELD demonstrated potential antioxidant property, in a concentration-dependent manner, reaching values of SC above 90% from the concentration of 100 µg/mL, wherein the highest concentration (200 µg/mL) also presented the best activity (95.52% of SC). Through the linear regression of plots, CELD presented 29.18 µg/mL of IC<sub>50</sub> ( $y = 1.565x + 4.339$ ) and AA showed 5.86 µg/mL ( $y = 6.951x + 9.278$ ) in the same parameter.

**Table 1**

DPPH scavenging capacity of CELD and ascorbic acid

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	SC (%)	
	CELD	AA
200	95.52 $\pm$ 2.86	96.88 $\pm$ 0.14
100	90.04 $\pm$ 1.64	96.65 $\pm$ 0.42
50	71.49 $\pm$ 4.76	96.42 $\pm$ 0.14
25	43.09 $\pm$ 1.08	96.36 $\pm$ 0.18
12.5	25.09 $\pm$ 2.98	96.12 $\pm$ 0.36
6.25	13.34 $\pm$ 0.80	52.29 $\pm$ 0.69
3.125	7.38 $\pm$ 0.86	31.29 $\pm$ 0.50

Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. DPPH scavenging capacity (SC), Crude extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD), Ascorbic acid (AA)

The  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay is based on the discoloration of  $\beta$ -carotene when oxidized by free radicals formed from linoleic acid structure in elevated temperatures, which is detected in loss of absorbance at 470 nm. In this experiment, the addition of CELD (50  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibit the  $\beta$ -carotene oxidation in approximately 39%, while the synthetic antioxidant standard utilized (BHT at 50  $\mu\text{g/mL}$ ) was able to inhibit the oxidation in about 70%.

### 3.2. Biochemical and hematological parameters

As shown in Table 2,  $\text{HgCl}_2$  injection induced hepatic and renal dysfunction in both groups 2 and 3. In relation to biochemical parameters, we could observe that the presence of mercury caused an increase in the activity of AST and ALT, as well as elevated levels of BUN and CRE, in comparison to group 1. Interestingly, the pre-treatment of animals with CELD (group 3) was able to mitigate the elevation of such parameters. Considering the hematological analysis (Table 3), we observed that group 3 had increased level of leukocytes, in comparison to groups 1, 2 and 4. The administration of mercury caused an increase of neutrophils and decrease of lymphocytes levels, while the pre-treatment with CELD (group 3) mitigated these changes. Moreover, the results demonstrate that rats from group 4 did not present any significant modifications, when compared to group 1. The values of RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC, PTL, monocytes, eosinophils and basophils presented no significant alterations between groups.

**Table 2**

Effect of CELD (400 mg/kg), mercury and their combination on serum biochemical parameters of rats

Biochemical parameters	Study group			
	Group 1 (Control)	Group 2 ( $\text{HgCl}_2$ )	Group 3 (CELD+ $\text{HgCl}_2$ )	Group 4 (CELD)
AST (U/L)	110.283 $\pm$ 40.731 <sup>a</sup>	639.767 $\pm$ 117.827 <sup>b</sup>	457.267 $\pm$ 132.031 <sup>c</sup>	103.450 $\pm$ 8.940 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	56.167 $\pm$ 2.229 <sup>a</sup>	96.333 $\pm$ 19.033 <sup>b</sup>	65.667 $\pm$ 10.967 <sup>c</sup>	58.000 $\pm$ 6.419 <sup>a,c</sup>
BUN (mg/dL)	50.217 $\pm$ 5.615 <sup>a</sup>	233.133 $\pm$ 37.847 <sup>b</sup>	160.783 $\pm$ 15.438 <sup>c</sup>	51.817 $\pm$ 8.026 <sup>a</sup>
CRE (mg/dL)	0.467 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>	2.550 $\pm$ 0.302 <sup>b</sup>	1.733 $\pm$ 0.378 <sup>c</sup>	0.483 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. Two-way ANOVA followed by Tukey test (n = 6). Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE) and

*Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD). Values not sharing a common superscript letter differ significantly. The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ .

**Table 3**

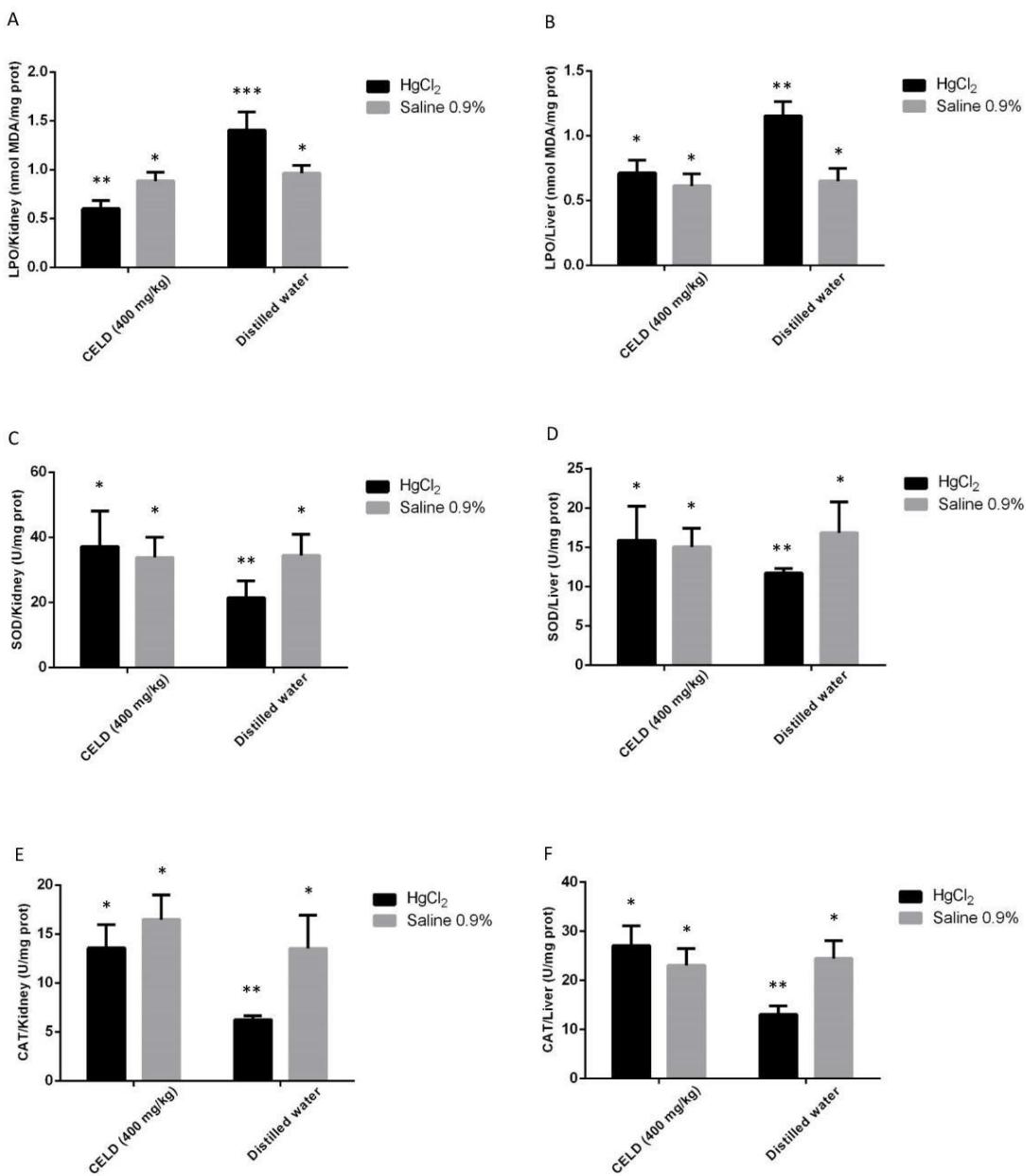
Effect of CELD (400 mg/kg), mercury and their combination on hematological parameters of rats

Hematological parameters	Study group	Group 1 (Control)	Group 2 (HgCl <sub>2</sub> )	Group 3 (CELD+HgCl <sub>2</sub> )	Group 4 (CELD)
RBC (X10 <sup>6</sup> /µL)	7.637 ± 0.431 <sup>a</sup>	7.520 ± 0.670 <sup>a</sup>	7.543 ± 0.422 <sup>a</sup>	7.743 ± 0.426 <sup>a</sup>	
HGB (g/dL)	13.517 ± 0.868 <sup>a</sup>	13.783 ± 1.469 <sup>a</sup>	13.400 ± 0.772 <sup>a</sup>	14.167 ± 0.717 <sup>a</sup>	
HCT (%)	44.733 ± 2.505 <sup>a</sup>	45.817 ± 4.883 <sup>a</sup>	44.350 ± 2.815 <sup>a</sup>	45.500 ± 2.460 <sup>a</sup>	
MCV (fL)	58.667 ± 0.644 <sup>a</sup>	59.417 ± 1.091 <sup>a</sup>	58.833 ± 0.889 <sup>a</sup>	58.633 ± 1.044 <sup>a</sup>	
MCHC (g/dL)	30.167 ± 0.450 <sup>a</sup>	30.050 ± 0.351 <sup>a</sup>	30.200 ± 0.502 <sup>a</sup>	30.550 ± 0.451 <sup>a</sup>	
PLT (X10 <sup>3</sup> /µL)	968.167 ± 94.334 <sup>a</sup>	877.000 ± 135.636 <sup>a</sup>	889.833 ± 132.881 <sup>a</sup>	935.667 ± 114.633 <sup>a</sup>	
WBC (X10 <sup>3</sup> /µL)	7.583 ± 1.264 <sup>a</sup>	5.817 ± 1.160 <sup>a</sup>	9.833 ± 2.000 <sup>b</sup>	7.533 ± 0.774 <sup>a</sup>	
Lymphocytes (%)	77.000 ± 7.975 <sup>a</sup>	35.00 ± 7.720 <sup>b</sup>	59.66 ± 5.922 <sup>c</sup>	76.83 ± 4.309 <sup>a</sup>	
Neutrophils (%)	21.50 ± 8.216 <sup>a</sup>	62.00 ± 8.649 <sup>b</sup>	35.50 ± 7.092 <sup>a</sup>	18.33 ± 3.141 <sup>a</sup>	
Monocytes (%)	1.33 ± 0.516 <sup>a</sup>	1.83 ± 1.329 <sup>a</sup>	3.33 ± 2.251 <sup>a</sup>	2.83 ± 1.835 <sup>a</sup>	
Eosinophils (%)	0.33 ± 0.816 <sup>a</sup>	0.667 ± 1.033 <sup>a</sup>	0.667 ± 0.516 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.894 <sup>a</sup>	
Basophils (%)	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	

Values are expressed as mean ± S.D. Two-way ANOVA followed by Tukey test ( $n = 6$ ). Red blood cells counts (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT), leukocytes (WBC) and *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD). Values not sharing a common superscript letter differ significantly. The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ .

### 3.3. Oxidative stress/Antioxidant status *in vivo*

Figure 1 shows that the administration of HgCl<sub>2</sub> caused a significative increase in the lipid peroxidation in group 2, which is evidenced by the elevation of LPO levels in kidney and liver, when compared to group 1. The pre-treatment with CELD 400 mg/kg (group 3) significantly reduced the LPO near to normal levels in liver and showed even more remarkable activity in the kidney, in which the LPO reached lower values than the group 1. The plant extract alone (group 4) did not show any statistical significant variation in the parameters above when compared to group 1 (graphics A and B). Moreover, the activities of the antioxidant enzymes SOD and CAT were reduced after administration of mercury, in group 2. The pre-treatment with CELD (group 3) was able to revert this effect, significantly increasing the activities of these enzymes, in both renal and hepatic tissues. No significant changes were observed in animals from group 4 in comparison to those from group 1 (graphics C, D, E and F).

**Figure 1**

Effect of CELD (400 mg/kg), mercury and their combination on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in liver and kidney tissues. Columns represent the mean  $\pm$  S.D (n = 6). Lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and *Dolichandra unguis-cati* leaves (CELD). Bars with the same symbol indicate statistical similarity.

#### 4. Discussion

The exposure and accumulation of mercury in biological tissues leads to the development of oxidative stress and thus to severe damage and impairment of the physiological functions of many vital organs of the organism (Costa-Malaquias et al. 2014). There exists direct and indirect pathways by which mercury expresses its toxicity and cause

the oxidative stress. The direct one refers to the formation of free radicals as consequence of its metabolism by cytochrome P450, which induces an increase of lipid peroxidation (Madureira et al. 2007). The indirect pathway is based on the affinity that mercury has to thiols groups present in important antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase. By forming chemical bonds with these enzymes, mercury causes perturbations in their three-dimensional conformations, which tend the molecules to lose their native characteristics and greatly compromise their functions (Sharma et al. 2014). Since superoxide dismutase is responsible for catalyzing the conversion of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide and catalase complements this function by converting hydrogen peroxide into oxygen and water, the decreased activity of these enzymes also results in an elevation of reactive oxygen species (ROS), contributing to increase the oxidative stress (Carillon et al. 2013; Tang et al. 2016).

In the current study, the acute exposure to  $\text{HgCl}_2$  resulted in significant oxidative stress in animals, evidenced by the increase in the levels of lipid peroxidation and decrease in the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT. The pre-treatment with CELD (group 3) remarkably attenuated the Hg-induced oxidative damage by restoring the highly increased hepatic and renal LPO levels to physiological limits, as well as by increasing the activities of SOD and CAT. The role of CELD in the elimination of the oxidative injuries may be attributed to its antioxidant properties and ability to scavenge free radicals, as observed in this study through the DPPH and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays. The plant sample presented interesting  $\text{IC}_{50}$  (29.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and IO% (39%) when compared with other works found in the literature. Neto et al (2016) evaluated the DPPH scavenging capacity of *Tanaecium cyrtanthum* (Bignoniaceae) leaves and obtained an  $\text{IC}_{50}$  of 43.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; using the same test system, Parente et al (2016) studied the leaves of *Crescentia cujete* (Bignoniaceae) and found an  $\text{IC}_{50}$  of 34.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tepe et al (2006) determined the IO% of *Centaurea mucronifera* (32.2%) and *Sideritis libanotica* subsp.*linearis* (38.5%).

The increased concentration of ROS leads to many alterations in the lipid composition and protein integrity of cells membranes, impairing its physiological functions (Castro et al. 2007), fact that may have contributed to the alterations identified in our work. In relation to biochemical parameters, we could observe that the administration of mercury increased the dosages of AST, ALT, BUN and CRE. Serum AST and ALT are sensitive markers of hepatocellular damage, while BUN and CRE are considered to be traditional markers for kidney functions and renal structural integrity, thus the results obtained in our work showed that the administration of mercury was able to cause hepat- and nephro-toxicities (Gowda et al. 2010; Ramaiah 2011). Considering the hematological parameters, rats exposed to mercury had higher values of neutrophils than lymphocytes, which represents an inversion of physiological values for Wistar rats, a fact known to be consequence of oxidative stress (El-Boshy et al. 2015).

Another interesting result obtained in this study suggest that pre-treatment with CELD at 400 mg/kg inhibited part of Hg-induced liver and kidney damage as evidenced by decreased dosages of AST, ALT, BUN and CRE. This finding indicates that CELD tends to mitigate liver and kidney lesions by amending the integrity and fuctions of the cells membrane. Consequently, the leakage of hepatocytes' intracellular constituents into the blood is suppressed and the kidney' blood filtration system is improved, exhibiting hepat- and nephro-protective activities, respectively (Cheung and Lafayette 2013; Leamy et al. 2013). Moreover, pre-treatment with CELD was also able to reverse the hematological inversion of neutrophils and lymphocytes and caused animals from group 3 to present higher values of WBC, which indicates an improvement in the organism's antioxidant defenses, in response to tissue damage caused by  $\text{HgCl}_2$  (Maheswaran et al. 2008). Our results are in agreement with some studies found in the literature that demonstrate protective effects of natural compounds against

intoxications caused by heavy metals (Kumar et al. 2013; Dewanjee et al. 2013; Ercis et al. 2015; Gao et al. 2016).

The beneficial activities of CELD against an acute intoxication by HgCl<sub>2</sub> identified in this study may be directly related to the biological properties of chemical compounds found in this extract. A previous UHPLC/MS-study from our research group identified the presence of chlorogenic acid, vanillinic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, rosmarinic acid, quercitrin, *trans*-cinnamic acid, quercetin, luteolin and apigenin (Brondani et al. 2016). Many studies have demonstrated the potent ROS-scavenging activity of these compounds and their ability to mitigate the toxic effects of various xenobiotics, mainly at hepatic and renal levels. Zhao et al (2014) demonstrated the synergistic protective effect of chlorogenic acid, apigenin and caffeic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Domitrovic et al (2014a,b) showed the nephroprotective effect of rosmarinic acid and chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. Shi et al (2013), Yang et al (2014) and Ali et al (2016) also indicated the hepatoprotective effect of chlorogenic acid and quercetin. Therefore, the hepato- and nephro-protection of CELD identified in our study may be attributed to the antioxidant capacity of its chemical constituents.

## 5. Conclusion

Our results demonstrated that the administration of mercuric chloride caused lipid peroxidation, depletion of antioxidant enzymes and alterations in biochemical and hematological parameters. The hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves contained compounds with antioxidant properties, which may explain its ability to attenuate the damages caused by chloride mercury poisoning, through improvements in biochemical and hematological parameters, as well as restoration of the redox balance.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of CAPES/Brazil and Bioclin/Quibasa for the donation of commercial kits.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Aboutabl EA, Hashem FA, Sleem AA, Maamoon AA (2008) Flavonoids, anti-nflammatory activity and cytotoxicity of *Macfadyena uniguis-cati* L. Afr J Tradit Complement Altern Med 5(1):18-26
- Aebi HE (1983) Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York.
- Ali FT, Hassan NS, Abd Rabou RR (2016) Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. Int J Res Med Sci 4(4):1147-1153
- Buege SC, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 52:302–310
- Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R (2013) Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. Pharm Res 30(11):2718-2728
- Cheung KL, Lafayette RA (2013) Renal physiology of pregnancy. Adv Chronic Kidney Dis 20:209-214
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS et al (2002) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Sci 163:1161-1168

- Costa-Malaquias A, Almeida MB, Monteiro JRS et al (2014) Morphine protects against methylmercury intoxication: a role for opioid receptors in oxidative stress?. PLoS One. doi:10.1371/journal.pone.0110815
- De Castro J, Hernández-Hernández A, Rodríguez MC (2007) Comparison of changes in erythrocyte and platelet phospholipid and fatty acid composition and protein oxidation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Platelets 18(1):43-51
- Dewanjee S, Sahu R, Karmakar S, Gangopadhyay M (2013) Toxic effects of lead exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves. Food Chem Toxicol 55:78-91
- Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N (2014) Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. Toxicology 324:98-107
- Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević-Orlić Z, Škoda M (2014) Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. Food Chem Toxicol 66:321-328
- Duarte DS, Dolabela MF, Salas CE, Rasian DS et al (2000) Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). J Pharm Pharmacol 52(3):347-352
- Ercis K, Aydoğan S, Atayoğlu AT, Silici S (2015) Effect of propolis on erythrocyte rheology in experimental mercury intoxication in rats. Environ Sci Pollut Res 22(16):12534-12543
- Fu J, Hu X, Tao X et al (2013) Risk and toxicity assessments of heavy metals in sediments and fishes from the Yangtze River and Taihu Lake, China. Chemosphere 93:1887-1895
- Gado AM, Aldahmash BA (2013) Antioxidant effect of arabic gum against mercury chloride-induced nephrotoxicity. Drug Des Devel Ther 7:1245-1252
- Gao D, Zeng NL, Zhang P et al (2016) Rhubarb anthraquinones protect rats against mercuric chloride ( $HgCl_2$ )-induced acute renal failure. Molecules. doi:10.3390/molecules21030298
- Gupta VK, Singh S, Agrawal A et al (2015) Phytochemicals mediated remediation of neurotoxicity induced by heavy metals. Biochem Res Int. doi:10.1155/2015/534769
- Kumar D, Singh S, Singh AM, Rizvi SI (2013) Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract provides protection against mercuric chloride-induced oxidative stress in Wistar strain rats. Pharm Biol 51(4):441-446
- Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD (2013) Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. Prog Lipid Res 52:165-174
- Lorenzi H, Matos FJA (2008) Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. Plantarum, Nova Odessa
- Madureira P, Cunha EM, Aguas AP (2007) Acute depletion and recovery of peritoneal B-1 lymphocytes in BALB/c mice after a single injection of mercury chloride. Immunopharmacol Immunotoxicol 29:311-322
- Maheswaran R, Devapaul A, Muralidharan S et al (2008) Haematological studies of fresh water fish, *Clarias batrachus* (L.) exposed to mercuric chloride. Int J Integr Biol 2(1):49-54
- Mokbel MS, Hashinaga F (2006) Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruits tissues. Food Chemistry 94(4):529-534
- Neto JRL, Uchoa ADA, De Moura PA et al (2016) Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. J Med Plants Res 10(27):409-416
- Oda SS, El-Ashmawy IM (2012) Protective effect of silymarin on mercury-induced acute nephro-hepatotoxicity. Glob Vet 9(4):376-383
- Othman MS, Safwat G, Aboulkhair M, Abdel Moneim AE (2014) The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. Food Chem Toxicol 69:175-181
- Parente FGG, De Oliveira AP, Rodrigues CMSC et al (2016) Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). J Chem Pharm Res 8(2):231-236
- Pereira C, Barros L, Ferreira ICRF (2016) Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. J Sci Food Agric 96:1068-1084
- Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ (2014) Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. Biomed Res Int. doi:10.1155/2014/640754

Shi H, Dong L, Jiang J et al (2013) Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. Toxicology 303: 107-114

Siqueira J, De Freitas EM, Perico E (2014) Influência de reguladores de crescimento no cultivo in vitro de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann a partir de estacas caulinares. Iheringia Serie Botanica 69(2):341-346

Sun M, Zigman S (1978) An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. Anal Biochem 90(1):81-89

Tang PS, Hihara Y, Yumoto I et al (2016) Overexpressed superoxide dismutase and catalase act synergistically to protect the repair of PSII during photoinhibition in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Plant Cell Physiol 57(9):1899-1907

Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA et al (2006) Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. linearis (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. Food Chem 98:9-13

Uma C, Poornima K, Surya S et al (2012) Nephroprotective effect of ethanolic extract of *Tabernaemontana coronaria* in mercury chloride induced renal damage in wistar albino rats. Int J Chem Eng Appl 3(4):269-273

Yang SA, Jung YS, Lee SJ et al (2014) Hepatoprotective effects of fermented field water-dropwort (*Oenanthe javanica*) extract and its major constituents. Food Chem Toxicol 67:154-160

Zhao J, Zhang Z, Dai J et al (2014) Synergistic protective effect of chlorogenic acid, apigenin and caffeic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in male mice. RSC Adv 4:43057-43063

### 3 DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais para prevenção e tratamento de enfermidades é conhecida desde tempos remotos, sendo que a sua aplicação na terapêutica foi sendo moldada com base no conhecimento empírico popular. Contudo, esta prática é frequentemente associada à limitações na elucidação das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos compostos vegetais, constituindo, assim, um real problema de saúde pública. Neste trabalho, realizamos diferentes abordagens para a melhor compreensão do perfil toxicológico de *Dolichandra unguis-cati*, seja através de ensaios *in vitro* como por ensaios *in vivo*, bem como para a identificação de propriedades biológicas e da composição fitoquímica.

Partindo-se de estudos *in vitro*, observamos que o extrato bruto das folhas de *Dolichandra unguis-cati* (CELD) não apresentou atividades genotóxica e mutagênica em nenhuma das concentrações testadas (1, 10 e 100 µg/mL), o que representa um resultado de fundamental importância, uma vez que expressa a incapacidade dos constituintes vegetais desta espécie em interagir com o material genético e, consequentemente, causar lesões celulares reversíveis e/ou irreversíveis e o aparecimento de tumores (MURPHY et al., 2013). Mais ainda, a diminuição da

viabilidade celular que CELD (10 e 100 µg/mL) apresentou, de maneira dose-dependente no estudo de citotoxicidade, pode representar um potencial efeito anti-tumoral desta planta (BEZERRA et al., 2008), ideia que, no entanto, necessita de estudos mais aprofundados com relação a especificidade e reproduzibilidade desta ação quando testada em células tumorais.

Posteriormente, procedemos com os estudos *ex vivo* de maneira a complementar os dados obtidos pelos ensaios *in vitro*, na medida em que fatores biológicos influenciam no comportamento toxicológico de um xenobiótico. Como citado anteriormente, o estudo agudo avalia a toxicidade de uma substância administrada em dose única ou múltiplas durante um período de 24 horas, enquanto que na exposição subaguda são utilizadas pelo menos três doses, administradas diariamente por um período de 28 dias. No experimento agudo, observamos que o tratamento com CELD na dose de 2000 mg/kg não causou mortalidade nem mudanças no peso corporal e no comportamento dos ratos. De acordo com a OECD 423, desde que todos os animais sobreviveram até o dia da eutanásia programada, o extrato pode ser considerado de baixa toxicidade e deve ser incluído na categoria 5 do respectivo guia, com uma DL<sub>50</sub> estimada entre 2000-5000 mg/kg (OECD 407, 1995; OECD 423, 2001). Este experimento foi ainda complementado com o teste de letalidade *in vitro* frente *Artemia salina*, o qual indicou uma CL<sub>50</sub> de 3539.54 µg/mL, reiterando a baixa toxicidade da planta.

Com relação ao estudo de 28 dias, observamos que a administração de CELD, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, novamente não ocasionou a morte de animais, bem como não levou à alterações comportamentais e no peso corporal. Em ambos os estudos *ex vivo* citados, as alterações bioquímicas encontradas, relativas as dosagens de AST e ALT mostraram que, além de não exercer um efeito hepatotóxico, CELD indicou possuir uma possível atividade protetora para o fígado. O extrato mostrou-se ainda possivelmente útil na prevenção de dislipidemias e no tratamento de suas consequências, ao diminuir as dosagens de colesterol total, em ambos os sexos, após o tratamento subagudo (GRUNDY, 2013). As demais alterações bioquímicas e hematológicas identificadas encontraram-se dentro dos limites fisiológicos, possivelmente representando idiossincrasias e variações individuais dos animais, não indicando, portanto, toxicidade. Além disso, por não ter exercido efeito tóxico a nível oxidativo nos estudos agudo e subagudo, ou seja, pelo balanço redox dos animais ter permanecido em equilíbrio após as administrações de CELD, não houve um aumento

na peroxidação lipídica e o organismo dos animais não necessitou aumentar a produção de suas defesas antioxidantes, fato identificado pela inalteração nas determinações de TBARS e CAT em homogenados de fígado e rim.

Após a avaliação do perfil toxicológico e a indicação de baixa toxicidade do extrato, procedemos com estudos visando a identificação de propriedades farmacológicas desta planta para justificar seus usos populares, bem como para sugerir novas aplicações na terapêutica. O primeiro estudo visou identificar a atividade antioxidante do extrato, através dos ensaios com DPPH e  $\beta$ -caroteno. Os resultados indicaram que CELD apresentou atividade sequestradora do radical livre DPPH, com um IC<sub>50</sub> de 29.18  $\mu\text{g/mL}$ , valor abaixo do encontrado para muitas outras espécies vegetais estudadas na literatura (NETO et al., 2016; PARENTE et al., 2016). Além disso, combateu a ação dos radicais livres resultantes da auto-oxidação do ácido linoleico e, assim, impediu em 39% a oxidação do  $\beta$ -caroteno, resultado que reforça a potencial atividade antioxidante exercida pelo extrato. Essa ação antioxidante identificada pode contribuir para justificar muitas das aplicações terapêuticas desta espécie, como por exemplo, seu uso no tratamento de inflamações, febre e reumatismo (GONÇALVES et al., 2013; WITACENIS et al., 2014).

Os possíveis efeitos hepatoprotetores de CELD sugeridos nos experimentos de toxicidade aguda e subaguda, juntamente com a atividade antioxidante observada nos estudos com DPPH e  $\beta$ -caroteno, indicaram uma potencial aplicação terapêutica até então desconhecida para esta espécie vegetal, a atividade protetora frente intoxicação por mercúrio. Sabe-se que o aumento na produção de radicais livres e a inibição de enzimas antioxidantes estão entre os principais mecanismos de ação tóxica do mercúrio (UMA et al., 2012), o que claramente foi identificado nos animais expostos ao metal, através de uma considerável elevação da peroxidação lipídica e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Por se tratar de um metal pesado extremamente tóxico e agressivo ao organismo, o mercúrio induz uma situação de estresse oxidativo, desregulando o equilíbrio natural existente entre espécies reativas e compostos antioxidantes (FARINA et al., 2013). Ao contrário do que foi observado nos experimentos de toxicidade *ex vivo*, nos quais não havia um agente agressor causando este desequilíbrio, no ensaio com mercúrio, em face à situação de desbalanço redox, CELD (400 mg/kg) demonstrou atividade protetora através da diminuição do processo

de peroxidação lipídica e da restauração na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Consequentemente, o extrato melhorou as propriedades fisiológicas das membranas celulares (diminuindo o extravazamento de constituintes do meio intracelular) e o funcionamento de órgãos vitais ao organismo, os quais foram severamente danificados após a exposição mercurial. Desta maneira, ao analisar parâmetros bioquímicos, verificamos uma diminuição no aumento de AST, ALT, BUN e CRE, importantes marcadores de danos hepáticos e renais, respectivamente (GOWDA et al., 2010; RAMAIAH, 2011). Além disso, considerando-se os parâmetros hematológicos, o extrato reverteu a inversão entre linfócitos e neutrófilos (consequência do estresse oxidativo) e aumentou os níveis de WBC, indicando um possível estímulo à resposta imune (MURUVE et al., 2008).

As ações biológicas consubstanciadas neste trabalho podem ser relacionadas aos constituintes químicos identificados e quantificados nas folhas de *Dolichandra unguis-cati*, muitos dos quais sabidamente exercem efeitos benéficos ao organismo. Através de UHPLC/MS foram identificados, em ordem decrescente de concentração, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanilínico, rutina, luteolina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido rosmariníco, ácido *trans*-cinâmico, apigenina, quercitrina e quercetina. Os métodos espectrofotométricos utilizados ainda forneceram informações a respeito da quantidade global de polifenóis, flavonóides e taninos condensados, as quais complementaram o entendimento acerca da composição química desta espécie. Nesse sentido, vários dos bioativos mencionados destacam-se pela reconhecida atividade antioxidante, efeitos hepato e nefroprotetores e ação hipocolesterolêmica; tais propriedades ratificam os achados científicos obtidos nesse trabalho (ALI; HASSAN; ABDRABOU, 2016; SHI et al., 2013; ZHAO et al., 2014).

#### 4 CONCLUSÃO

Através dos estudos realizados com o extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Dolichandra unguis-cati* (CELD), pôde-se concluir que:

- O estudo sobre a composição fitoquímica de CELD por UHPLC/MS permitiu detectar e quantificar a presença de 12 compostos: ácido clorogênico, ácido

cafeico, ácido vanilínico, rutina, luteolina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido rosmarínico, ácido *trans*-cinâmico, apigenina, quercitrina e quercetina;

- Os ensaios *in vitro* demonstraram a ausência de genotoxicidade e mutagenicidade do extrato nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Além disso, o extrato nas doses de 10 e 100 µg/mL apresentou uma potencial atividade anti-tumoral pela ação citotóxica;
- Os tratamentos *ex vivo*, agudo e subagudo, de ratos Wistar com CELD não causaram a letalidade de nenhum animal, assim como não resultaram em alterações tóxicas relativas às análises sanguíneas, comportamentais e de peso corporal, sendo o extrato considerado de baixa toxicidade pela OECD;
- O ensaio de letalidade por *Artemia salina* ratificou a baixa toxicidade do extrato ao indicar uma DL<sub>50</sub> de 3539,54 µg/mL;
- Ambos os estudos *ex vivo* indicaram que, além de não possuir ação hepatotóxica, CELD pode apresentar propriedades hepatoprotetoras. Além disso, no estudo de toxicidade subaguda, identificou-se uma possível atividade hipocolesterolêmica;
- O extrato apresentou capacidade antioxidante através do sequestro do radical livre DPPH e da inibição da oxidação do β-caroteno;
- O extrato foi capaz de reduzir os efeitos nocivos da intoxicação aguda de ratos Wistar por mercúrio, mitigando alterações em dosagens sanguíneas (AST, ALT, BUN e CRE), bem como diminuindo o processo de peroxidação lipídica e restabelecendo a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT;

Sendo assim, as atividades farmacológicas identificadas nesse estudo, juntamente com o baixo grau de toxicidade do extrato ressaltam a importância da espécie na terapêutica e estimulam a continuidade de pesquisas para a identificação de novas propriedades biológicas aplicáveis.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho, sugere-se a realização de estudos futuros, como por exemplo: testar a atividade citotóxica do extrato frente a células de diferentes linhagens tumorais; testar a atividade hipocolesterolêmica do extrato em ratos com dislipidemia induzida; isolar e caracterizar novos componentes bioativos presentes no extrato e avaliar a aplicabilidade da planta para outros fins terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- ABOUTABL, E. A. et al. Flavonoids, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Macfadyena unguis-cati* L. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 5., n. 1, p. 18-26, 2008.
- AGRA, M. de F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALI, F. T.; HASSAN, N. S.; ABDRABOU, R. R. Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1147-1153, 2016.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais e ritualísticas**. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011. 221 p.
- ALVIM, N. A. T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. v. 14, n. 3, p. 316-323, 2006.
- AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. São Paulo: InterTox, 2003.
- BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - Enfermagem**. Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.
- BEZERRA, D. P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.
- BOYNE, R. L. et al. Variation in leaf morphology of the invasive cat's claw creeper *Dolichandra unguis-cati* (Bignoniaceae). **Australian Journal of Botany**. Collingwood, v. 61, n. 6, p. 419-423, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <[http://www.lex.com.br/doc\\_360083\\_RESOLUCAO\\_N\\_48\\_DE\\_16\\_DE\\_MARCO\\_DE\\_2004.aspx](http://www.lex.com.br/doc_360083_RESOLUCAO_N_48_DE_16_DE_MARCO_DE_2004.aspx)>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/orientacao\\_RDC48.pdf](https://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/orientacao_RDC48.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006b. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Poder Executivo, Brasília, 23 de junho de 2006b.

Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm)>. Acesso em: 20 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Ministerial no 971, de 03 de maio de 2006a. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Seção 1, No 84, Brasília, 4 de maio de 2006a. Disponível em: <[http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/portaria971\\_03\\_05\\_06.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/portaria971_03_05_06.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886/GM, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no SUS. Disponível em: <[http://www.farmacia.pe.gov.br/sites/farmacia.saude.pe.gov.br/files/farmacia\\_viva20\\_-portaria\\_n\\_886\\_de\\_20\\_de\\_abril\\_de\\_2010.pdf](http://www.farmacia.pe.gov.br/sites/farmacia.saude.pe.gov.br/files/farmacia_viva20_-portaria_n_886_de_20_de_abril_de_2010.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. 2012. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31). Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/portaldab/biblioteca.php?conteudo=publicacoes/cab31>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Brasília, DF, 6 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=sus-tem-interesse-em-71-especies-de-plantas-medicinais>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CAROCCI, A. et al. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 229, p. 1-18, 2014.

CHEN, X. W. et al. Clinical herbal interactions with conventional drugs: from molecules to maladies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 31, p. 4836-4850, 2011.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637S-646S, 2000.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 60, i. 4, p. 212-220, 2009.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, G.; POZZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DRISCOLL, C. T. et al. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 4967-4983, 2013.

DUARTE, D. S. et al. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 347-352, 2000.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole, 2001. 163 p.

FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, v. 62, i. 5, p. 575-594, 2013.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 51-54, 2004.

GOMES, A. et al. Herbs and herbal constituents active against snake bite. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 865-878, 2010.

GONÇALVES, S. et al. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 465-471, 2013.

GOWDA, S. et al. Markers of renal function tests. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 170-173, 2010.

GRUNDY, S. M. An International Atherosclerosis Society Position Paper: global recommendations for the management of dyslipidemia. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 7, n. 6, p. 561-565, 2013.

GUPTA, P. **Fundamentals of Toxicology**: essential concepts and applications. 1. ed. Academic Press, 2016. 422 p.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936 p.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 35-42, 2013.

IZZO, A. A.; ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: an updated systematic review. **Drugs**, v. 69, n. 13, p. 1777-1798, 2009.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **NeuroToxicology**, v. 27, i. 4, p. 492-500, 2006.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

- LEE, S. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, i. 1, p. 131-137, 2005.
- LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, i. 1, p. 208-219, 2014.
- LI, Z. et al. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 468-569, p. 843-853, 2014.
- LIMA, D. F. et al. Knowledge and use of medicinal plants for users of two basic health units. **Revista Rene**, v. 15, n. 3, p. 383-390, 2014.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - Nativas e exóticas**. 2. ed. Plantarum, 2008. 560 p.
- LOURES, M. C. et al. Contribuições da fitoterapia para a qualidade de vida: percepções de seus usuários. **Revista Enfermagem UERJ**. Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 278-283, 2010.
- MATSUDA, M.; SHIMOMURA, L. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. e330-e341, 2013.
- MORS, W. **Medicinal plants of Brazil**. 1. ed. Califórnia: Reference Publications, 2000. 501 p.
- MURPHY, S. J. et al. Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. **Gastroenterology**, v. 145, n. 5, p. 1098-1109, 2013.
- MURUVE, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. **Nature**, v. 452, n. 7183, p. 103-107, 2008.
- NAGASE, M. et al. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration. **Redox Report**, v. 21, n. 3, p. 104-112, 2016.
- NETO, J. da R. L. et al. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 27, p. 409-416, 2016.
- NEVADO, J. J. B. et al. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International**, v. 36, i. 6, p. 593-608, 2010.
- OBE, G. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, n. 1-2, p. 17-36, 2002.

OECD (Organization for economic cooperation and development), 1995. **Guideline 407.** Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. 468 adopted by the council on 27th, july, 1995.

OECD (Organization for economic cooperation and development), 2001. **Guideline 423.** Acute oral toxicity – acute toxicity class method. 470 adopted by the council on 17th, december 2001.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 474 p.

PARENTE, F. G. G. et al. Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 231-236, 2016.

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 1998.

PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007.

RAMAIAH, S. K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31. n. 1, p. 161-172, 2011.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. Porto Alegre, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICE, K. M. et al. Environmental mercury and its toxic effects. **Journal of Preventive Medicine & Public Health**, v. 47, n. 2, p. 74-83, 2014.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, i. 9, p. 2709-2729, 2014.

SAHU, B. D. et al. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 453-460, 2013.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, i. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SHI, H. et al. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. **Toxicology**, v. 303, p. 107-114, 2013.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010. 1104 p.

SIVIERO, A. et al. Plantas medicinais em quintais urbanos de Rio Branco, Acre. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 14, n. 4, p. 598-610, 2012.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto – Enfermagem**. Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UMA, C. et al. Nephroprotective effect of ethanolic extract of tabernaemontana coronaria in mercuric chloride induced renal damage in wistar albino rats. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 3, n. 4, p. 269-273, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. v. 99. CRC Press, 2008. 896 p.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 369-376, 2005.

WHO. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review. Geneva: World Health Organization, 1998. 45 p.

WHO. **The World Medicines Situation 2011**. Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva: World Health Organization, 2011. 12 p.

WITAICENIS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 240-246, 2014.

YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90-101, 2013.

ZHAO, J. et al. Synergistic protective effect of chlorogenic acid, apigenin and caffeic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in male mice. **RSC Advances**, v. 4, i. 81, p. 43057-43063, 2014.

## ANEXO A - CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM



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

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo fitoquímico, toxicológico e avaliação da atividade antioxidante das folhas de Dolichandra unguis-cati..", protocolada sob o CEUA nº 7715120115, sob a responsabilidade de **Melânia Palermo Manfron** e equipe; **Juliana Calil Brondani**; **Andrea Regina Haas da Silva**; **Fernanda Ziegler Reginato**; **Liliane de Freitas Bauermann** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 02/03/2015.

We certify that the proposal "Phytochemical studies, toxicology and evaluation of the antioxidant activity of Dolichandra unguis-cati leaves ", utilizing 64 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 7715120115, under the responsibility of **Melânia Palermo Manfron** and team; **Juliana Calil Brondani**; **Andrea Regina Haas da Silva**; **Fernanda Ziegler Reginato**; **Liliane de Freitas Bauermann** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 03/02/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2015** a **12/2015**

Área: **Farmácia Industrial**

Origem:	<b>Biotério Central UFSM</b>	sex:	<b>Machos e Fêmeas</b>	idade:	<b>7 a 7 semanas</b>	N:	<b>64</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>					Peso:	<b>200 a 250 g</b>
Linhagem:	<b>Wistar</b>						

Resumo: Desde os tempos mais remotos, as plantas medicinais têm seu uso descrito por praticamente todos os povos. A partir dos conhecimentos tradicionais do uso das plantas medicinais na busca de solução de algum mal-estar ou a cura de alguma doença, surgiram interesses comerciais e científicos (MENGUE, 2001). Dolichandra unguis-cati, popularmente conhecida como unha-d-gato, é uma planta nativa de norte a sul do Brasil, além de ser encontrada no Egito e Índia Ocidental. Sua composição química inclui compostos como: corimboside, vicenina-2, queritrína, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, lupeol, b-sitosterol, b-sitosterilglicosídeo, alantoína and lapachol (DUARTE et al, 2000). Seu uso na medicina atual é bastante amplo. Estudos relatam atividades, tais como: ação anti-inflamatória, diurética, para tratamento da malária, doenças venéreas, picada de cobra, diarréia, febre, tosse, reumatismo, entre outras. Entretanto, apesar do amplo emprego desta planta na medicina popular, há pouca comprovação científica de suas propriedades farmacológicas, eficácia e segurança de seu uso (LORENZI E MATOS, 2008). Assim, torna-se importante avaliar a toxicidade de seu extrato bruto de forma aguda, na qual será administrada oralmente uma dose única de 2000 mg/Kg em ratos machos e fêmeas para observações físicas, comportamentais e testes bioquímicos. Bem como, avaliar a toxicidade através de um estudo subagudo em ratos machos e fêmeas, durante 28 dias, em diferentes concentrações do extrato bruto (100, 200 e 400 mg/Kg), o qual indicará se há um acúmulo de toxicidade com o uso contínuo do extrato da planta, quando utilizado para um tratamento que requer doses diárias.

Local do experimento: Laboratório da Fisiologia experimental no prédio 21

Santa Maria, 20 de novembro de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosenberg  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria



### Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos nefro e hepatoprotetores de Dolichandra unguis-cati frente a exposição mercurial in vivo.", protocolada sob o CEUA nº 7668030316, sob a responsabilidade de **Melânia Palermo Manfron** e equipe; Juliana Calil Brondani; Andreia Regina Haas da Silva; Fernanda Ziegler Reginato; Liliane de Freitas Bauermann - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 19/05/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of the renal and hepatoprotective effects of Dolichandra unguis-cati against mercury exposure in vivo", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 7668030316, under the responsibility of **Melânia Palermo Manfron** and team; Juliana Calil Brondani; Andreia Regina Haas da Silva; Fernanda Ziegler Reginato; Liliane de Freitas Bauermann - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 05/19/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2015](#) a [08/2017](#) Área: [Farmácia Industrial](#)

Origem:	<a href="#">Biotério Central UFSM</a>	sex:	<a href="#">Machos</a>	idade:	<a href="#">5 a 6 semanas</a>	N:	<a href="#">24</a>
Espécie:	<a href="#">Ratos heterogênicos</a>			Peso:	<a href="#">150 a 200 g</a>		
Linhagem:	<a href="#">Wistar</a>						

**Resumo:** O mercúrio é um metal líquido pesado branco-prateado, inodoro, de fácil volatilização e amplamente distribuído no ambiente, envolvido em diversos processos geológicos naturais. Pode-se apresentar sob três formas químicas: mercúrio elementar, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. Algumas dessas formas possuem características extremamente tóxicas quando em contato com o meio ambiente e/ou organismos (AGARWAL e BEHARI, 2007). A absorção em humanos se dá principalmente pela via inalatória por se tratar de um líquido extremamente volátil, sendo o cérebro e os rins os locais de maior deposição. Cerca de 80% do vapor de mercúrio inalado fica retido. Além disso, é o único metal absorvido através da pele íntegra (WHO, 1991).

As atividades industriais e a ingestão de alimentos contaminados, como por exemplo, peixes, são as principais fontes de intoxicação humana por este metal (AZEVEDO et al., 2003). Industrialmente, a maior aplicação do mercúrio metálico se dá nos garimpos, em células eletrolíticas para a produção do cloro e soda, na fabricação de termômetros, barômetros, lâmpadas, aparelhos elétricos e em amálgamas para uso odontológico. A aplicação dos compostos inorgânicos ocorre principalmente na indústria de eletrodos, polímeros sintéticos e como agentes antissépticos. Dentre as aplicações dos compostos orgânicos, se destaca o uso como fungicida, fumigante e inseticida (KAUR et al., 2006).

Frequentemente, este metal é associado a graves quadros de intoxicação, denominados hidrargirismo (KAUR et al., 2006). Dentre os sintomas de intoxicação aguda, podemos citar: formigamento e adormecimento dos lábios, mãos e pés, dores em articulações, estreitamento da visão, dificuldade na audição e distúrbios emocionais. Já quadros de intoxicações severas geralmente causam movimentos bruscos, vertigem, náuseas, vômitos e diarréia. Além disso, filhos de mães expostas ao metil-mercúrio tem apresentado retardos mentais, paralisia cerebral e crises convulsivas (Cano, 2014).

A intoxicação por mercúrio atinge o organismo de forma geral, acumulando-se em diversos órgãos, como fígado, rins, pulmão e órgãos do sistema nervoso central e periférico (FRANCO et al., 2006). Os principais mecanismos moleculares que poderiam explicar as consequências genotóxicas do mercúrio seriam: estresse oxidativo, ação sobre a rede de microtúbulos e ação nos mecanismos de reparo do DNA (Crespo-Lopez et al., 2009).

Alguns antioxidantes podem promover proteção contra a toxicidade do mercúrio (DRINGEN, 2000). Assim, torna-se importante investigar as atividades protetoras de extratos vegetais com ação antioxidante contra intoxicações por mercúrio. Sendo assim, o extrato bruto hidroalcoólico de *D. unguis-cati* (200 e 400 mg/Kg), será administrado, por via i.p., a ratos expostos ao mercúrio, a fim de se avaliar o efeito protetor preventivo desta planta.

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Experimental, prédio 21, UFSM.



*Comissão de Ética no Uso de Animais*

*da*

*Universidade Federal de Santa Maria*

Santa Maria, 20 de novembro de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

**ANEXO B – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO  
BOLETÍN LATINO AMERICANO Y DEL CARIBE DE PLANTAS MEDICINALES Y  
AROMÁTICAS**



13 de Octubre de 2016

**Dra.**  
**Juliana Calil Brondani**  
 Universidade Federal de Santa Maria  
 Brasil

Estimada Dra. Brondani:

En referencia a su artículo titulado: “**Determination of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of hydroethanolic extract of Dolichandra unguis-cati L. leaves in human leukocytes**”, de los autores **Juliana Calil Brondani, Lucas Damo Marangoni, Rachel de Lima, Michel Mansur Machadol & Melânia Palermo Manfron**, ha sido recibido el día 13 de Octubre de 2016 y ha sido asignado como **BLACPMA Nº 1315**. En toda correspondencia referida a este artículo cite el número asignado.

Le saluda

José L. Martínez  
 Editor Jefe  
 BLACPMA  
[www.blacpma.usach.cl](http://www.blacpma.usach.cl)

## ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*

### Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	JEP_2016_181
<b>Title</b>	Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of <i>Dolichandra unguis-cati</i> L. leaves in rats
<b>Article type</b>	Research Paper

### Abstract

**Ethnopharmacological relevance:** *Dolichandra unguis-cati* L. is a native climbing plant of Brazil, popularly known as "unha de gato". It has been traditionally used mainly as an antipyretic, anti-inflammatory and anti-tumor agent, yet little toxicological information is found in the literature. **Aim of the study:** To identify the chemical composition of the hydroethanolic extract obtained from the leaves of *Dolichandra unguis-cati* and to evaluate the acute and subacute toxicity in male and female rats, in order to assess the safety profile of this plant. **Materials and methods:** In the acute study, a single dose (2000 mg/kg) of the extract was orally administered to male and female rats. In the subacute study, the extract was orally administered to male and female rats at doses 100, 200 and 400 mg/kg for 28 days. Behavioral changes, catalase and lbars evaluations, biochemical, hematological and histopathological analysis were performed in both studies. *Artemia salina* was used as a lethality test. The extract's chemical composition was accessed through UHPLC/MS. **Results:** Chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, vanillinic acid, p-coumaric acid, rosmarinic acid, trans-cinnamic acid, luteolin, apigenin, querçitrin and querçetin were identified in the extract. In the acute treatment, the extract was classified as safe (category 5), according to the OECD guide. In relation to the subacute study, females showed a reduction in AST (100, 200 and 400 mg/kg), ALT (200 mg/kg) and BUN (100 and 200 mg/kg) levels. Both genders presented a reduction in the Chol dosage at all doses and male rats 400 mg/kg presented an increase in AST levels. No behavioral and histopathological changes were recorded. **Conclusions:** Our results indicate that the hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* leaves did not present relevant toxic effects when administered orally to male and female rats. The extract also showed a potential hypocholesterolemic activity.

**Keywords** *Dolichandra unguis-cati*; Acute toxicity; Subacute toxicity; UHPLC/MS.

**Corresponding Author** Juliana Calil Brondani

**Order of Authors** Juliana Calil Brondani, Fernanda Ziegler Reginato, Evelyne da Silva Brum, Marina de Souza Vencato, Cibele Lima Lhamas, Carine Viana Silva, Maria Izabel Ugalde Marques da Rocha, Liliane de Freitas Bauermann, Melânia Palermo Manfron