



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**GEANE RODRIGUES CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E  
AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E  
CICATRIZANTE EM *MUS MUSCULUS* DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE  
FOLHAS DE *JATROPHA MOLLISSIMA* (POHL) BAILL**

Recife

2023

**GEANE RODRIGUES CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E  
AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E  
CICATRIZANTE EM *MUS MUSCULUS* DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE  
FOLHAS DE *JATROPHA MOLLISSIMA* (POHL) BAILL**

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza

Recife

2023

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva,  
CRB4/1381

Chaves, Geane Rodrigues.

Caraterização fitoquímica, atividade antioxidante in vitro e avaliação de toxicidade e atividades antinociceptiva e cicatrizante em mus musculus de extrato hidroetanólico de folhas de jatropha mollissima (POHL) baill. / Geane Rodrigues Chaves. – 2023.

66 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão.  
Coorientadora: Ivone Antônia de Souza.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Euphorbiaceae. 2. Pinhão-bravo. 3. analgesia. 4. Cicatrizante. 5. Polifenóis. I. Napoleão, Thiago Henrique. (Orient.). II. Souza, Ivone Antônia de (Coorient.). III. Título.

572

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-251

**GEANE RODRIGUES CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E  
AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E  
CICATRIZANTE EM *MUS MUSCULUS* DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE  
FOLHAS DE *JATROPHA MOLLISSIMA* (POHL) BAILL**

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Data: 25/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Membro interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Leydianne Leite de Siqueira Patriota (Membro externo)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Rômulo Carlos Dantas da Cruz (Membro externo)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira Santos (Membro externo)

Universidade Federal de Pernambuco

## RESUMO

*Jatropha mollissima* (Pohl) Bail (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como “pinhão-bravo”, planta medicinal nativa e endêmica do semiárido do Nordeste do Brasil, tem sido amplamente estudada quanto a sua atividade antiviral, por melhorar quadros de doenças respiratórias. Contudo, são poucos os estudos que avaliam a segurança de seu uso toxicológico agudo, a atividade antioxidante, antinociceptiva e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de folhas de *J. mollissima* (JMLE, do inglês *J. mollissima leaf extract*). Em vista disso, neste trabalho após estudo prévio da fitoquímica no extrato das folhas por cromatografia de camada delgada (CCD) a presença de açúcares redutores, terpenos, derivados cinâmicos, flavonoides, fenóis e saponinas, foram evidenciados, e posteriormente a otimização analítica e separação dos compostos ocorreu por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no qual se observou que os três últimos compostos acima descritos foram majoritários. Concomitantemente um estudo farmacológico foi realizado. JMLE apresentou alta concentração de compostos fenólicos ( $620,63 \pm 1,47$  mg EAG/g) e flavonoides ( $22,55 \pm 0,55$  mg EQ/g). O perfil em CLAE apresentou sinais cromatográficos correspondentes a flavonoides e a derivados cinâmicos. Observou-se a Vitexina com um teor expressivo de  $1,104 \pm 0,0028$  g%. JMLE apresentou capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio com  $CI_{50}$  de  $123,4 \pm 1,2$   $\mu$ g/mL e foi capaz de eliminar os radicais livres DPPH e ABTS+ ( $CI_{50}$  de  $87,84 \pm 1,1$   $\mu$ g/mL e  $49,08 \pm 0,7$   $\mu$ g/mL), respectivamente. O extrato das folhas também demonstrou baixa atividade hemolítica, promovendo 18,16% de hemólise na maior concentração testada (10 mg/mL). No ensaio de toxicidade aguda, não houve mortalidade nem alterações comportamentais, hematológicas e histopatológicas nos camundongos. Foi detectado redução do perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e VLDL) quando comparado com o controle. O tratamento com JMLE nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg reduziu as contorções abdominais em 40,41%, 58,77% e 71,42%, respectivamente. No teste da dor induzida por formalina, o extrato nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg reduziu o tempo de lambida da pata na primeira fase em 30,19%, 47,58% e 65,24%, respectivamente, enquanto na segunda fase, a redução foi de 40,49%, 58,05% e 79,30%. Naloxona<sup>®</sup> (2 mg/kg, i.p.) inibiu o efeito de JMLE (200 mg/kg) em 65,54% na primeira fase e 86,39% na segunda fase do teste da formalina, indicando a participação de receptores opioides na ação do extrato. No teste de retirada de cauda, a administração oral de JMLE aumentou o tempo de latência em todos os períodos avaliados. O gel à base de JMLE (500 mg) apresentou resultados promissores na cicatrização

das feridas em relação ao controle negativo. Adicionalmente, uma aplicação oral do extrato em dosagem única de até 2000 mg/kg foi atóxica. O tratamento com o gel promoveu redução de 60,94% e 51,97% nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Assim, a JMLE mostrou propriedades farmacológicas promissoras e possivelmente os efeitos analgésicos em modelos de dor induzida por estímulos químicos e térmicos atuando pela via opiodérgica. Além de apresentar um efeito significativo na redução de feridas cutâneas com redução de citocinas pró-inflamatórias.

**Palavras-chave:** Euphorbiaceae; Pinhão-bravo; analgesia; cicatrizante; polifenóis.

## ABSTRACT

*Jatropha mollissima* (Pohl) Bail (Euphorbiaceae), popularly known as “pinhão-bravo”, a medicinal plant native and endemic to the semi-arid region of Northeast Brazil, has been widely studied for its antiviral activity, for improving respiratory diseases. However, there are few studies that evaluate the safety of its acute toxicological use, the antioxidant, antinociceptive and healing activities of the hydroalcoholic extract of *J. mollissima* leaves (JMLE). In view of this, in this work, after a previous study of the phytochemistry in the leaf extract by thin layer chromatography (TLC), the presence of reducing sugars, terpenes, cinnamic derivatives, flavonoids, phenols and saponins were highlighted, and subsequently analytical optimization and separation of the compounds occurred by high performance liquid chromatography (HPLC), in which it was observed that the last three compounds described above were the majority. At the same time, a pharmacological study was carried out. JMLE presented a high concentration of phenolic compounds ( $620.63 \pm 1.47$  mg EAG/g) and flavonoids ( $22.55 \pm 0.55$  mg EQ/g). The HPLC profile showed chromatographic signals corresponding to flavonoids and cinnamic derivatives. Vitexin was observed with a significant content of  $1.104 \pm 0.0028$  g%. JMLE presented total antioxidant capacity by the phosphomolybdenum method with IC<sub>50</sub> of  $123.4 \pm 1.2$  µg/mL and was able to eliminate free radicals DPPH and ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> of  $87.84 \pm 1.1$  µg/mL and  $49.08 \pm 0.7$  µg/mL), respectively. The leaf extract also demonstrated low hemolytic activity, promoting 18.16% hemolysis at the highest concentration tested (10 mg/mL). In the acute toxicity test, there was no mortality or behavioral, hematological and histopathological changes in the mice. A reduction in the lipid profile (total cholesterol, triglycerides, HDL, LDL and VLDL) was detected when compared to the control. Treatment with JMLE at doses of 50, 100 and 200 mg/kg reduced abdominal contortions by 40.41%, 58.77% and 71.42%, respectively. In the formalin-induced pain test, the extract at doses of 50, 100 and 200 mg/kg reduced paw licking time in the first phase by 30.19%, 47.58% and 65.24%, respectively, while in the second phase, the reduction was 40.49%, 58.05% and 79.30%. Naloxone® (2 mg/kg, i.p.) inhibited the effect of JMLE (200 mg/kg) by 65.54% in the first phase and 86.39% in the second phase of the formalin test, indicating the participation of opioid receptors in the action of the extract. In the tail flick test, oral administration of JMLE increased the time of latency in all periods evaluated. The JMLE-based gel (500 mg) showed promising results in wound healing compared to the negative control. Additionally, an oral application of the extract in a single dosage of up to 2000 mg/kg

was non-toxic. Treatment with the gel promoted a reduction of 60.94% and 51.97% in serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Thus, JMLE showed promising pharmacological properties and possibly analgesic effects in models of pain induced by chemical and thermal stimuli acting through the opioidergic pathway. In addition, it has a significant effect on reducing skin wounds with a reduction in pro-inflammatory cytokines.

**Keywords:** Medinal plant; Wild pine nuts; Photochemical profile; CCD and HPLC; Pharmacological study.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica do gênero <i>Jatropha</i> L .....	18
Figura 2 -	<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill .....	19
Figura 3 -	Distribuição geográfica de <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.....	20
Figura 4 -	Aspectos superficiais e representações histológicas da pele de acordo com cada fase da cicatrização da ferida	25
Figura 5 -	Avaliação de toxicidade aguda (OECD, 423) .....	27

### ARTIGO 1

Figure 1 -	A representative profile of <i>Jatropha mollissima</i> leaf extract (JMLE) on high performance liquid chromatography (HPLC) using a C18 column. Standards: St1 - caffeic acid; St2 – vitexin.....	39
Figure 2 -	The ultraviolet absorption spectra of the 10 peaks detected in performance liquid chromatography (C18 column) of the <i>Jatropha mollissima</i> leaf extract (JMLE).....	40
Figure 3 -	Representative photomicrographs of the liver, kidney spleen and lung of mice from the control group and the groups treated with the JMLE.....	43
Figure 4 -	Antinociceptive effect of JMLE on abdominal contortion.....	44
Figure 5 -	Antinociceptive effect of JMLE on both phases of the formalin assay.....	45
Figure 6 -	Investigation of mechanisms of antinociceptive activity of the JMLE in the formalin test.....	45
Figure 7 -	Antinociceptive effect of JMLE in the tail-immersion assay.....	46

### ARTIGO 2

Figure 1 -	Effect of FitoScar and JMHE-gel treatment on skin wound contraction in mice.....	54
Figure 2 -	Effect of FitoScar and JMHE-gel treatment on TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ levels.....	54

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1 -	Evaluation of food and water consumption and weight gain of animals from control and treated with the JMLE.....	41
Table 2 -	Hematological parameters of mice treated with the JMLE.....	41
Table 3 -	Biochemical parameters of blood of mice treated with the JMLE.....	42
Table 4 -	Evaluation of the relative weight (g/10 g animal body weight) of mice treated with the JMLE.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CK	Creatine kinase
CMHC	Concentração média de hemoglobina corpuscular
COX	Ciclo-oxigenase
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
d.C.	Depois de Cristo
DL50	Dose letal mediana
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
EMA	European Medical Agency
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gas Chromatography
GGT	Gama glutamil transferase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MHRA	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
NO	<i>Nitric oxide</i> (do inglês, óxido nítrico)
OECD	<i>The Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
RPM	Rotações por minutos
SNC	Sistema nervoso central

SNP	Sistema nervoso periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Total cholesterol
TG	Triglicerídeos
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante $\beta$
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCM	Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>15</b>
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	15
2.2	FAMÍLIA EUPHORBIACEAE <i>JUSS.</i> .....	16
2.3	GÊNERO <i>JATROPHA L.</i> .....	17
2.4	<i>JATROPHA MOLLISSIMA (POHL)BAILL.</i> .....	19
2.5	DOR.....	21
2.6	PROCESSO INFLAMATÓRIO E CICATRIZAÇÃO DE FERIDA.....	21
<b>2.6.1</b>	<b>Ferida.....</b>	<b>21</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Inflamação.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Cicatrização.....</b>	<b>24</b>
2.7	ESTUDOS DE TOXICIDADE.....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	GERAL.....	29
3.2	ESPECÍFICOS.....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
	ARTIGO 1 - <i>JATROPHA MOLLISSIMA (POHL) BAILL.</i>	
4.1	HYDROETHANOLIC LEAF EXTRACT HAS ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY WITHOUT SHOWING TOXICITY IN MICE.....	30
	ARTIGO 2 - HEALING EFFECT OF A HYDROETHANOLIC EXTRACT FROM <i>JATROPHA MOLLISSIMA</i> LEAVES IN <i>MUS MUSCULUS</i>	
4.2		50
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com mais de 45 milhões de espécies de plantas catalogadas e distribuídas em sete biomas, o Brasil abriga a maior biodiversidade do mundo. Sendo assim, as plantas são consideradas uma excelente fonte para a descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos. Em geral, esses materiais vegetais parecem ter baixa toxicidade quando comparados às drogas sintéticas, tornando-os candidatos viáveis para o desenvolvimento de novos medicamentos (SILVA et al., 2017; TUNGMUNNITHUM et al., 2018; ALBUQUERQUE et al., 2021).

A família Euphorbiaceae é uma das mais amplamente distribuídas no Brasil e no mundo. Com predominância em regiões tropicais e subtropicais, esta família está distribuída nos seis biomas brasileiros. Ela abriga 60 gêneros e aproximadamente 1000 espécies, sendo quatro gêneros e 601 espécies exclusivas dos biomas brasileiros e o gênero *Croton* o mais numeroso. Devido à sua importância econômica, a família Euphorbiaceae é cultivada em diversas regiões brasileiras, sendo também utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, tais como dermatoses, doenças vasculares, úlceras em pacientes acamados, e diabético, o que pode causar desconforto e afetar a qualidade de vida. (CAVALCANTE et al., 2020; HE et al., 2021).

Dentre os gêneros com importância medicinal dessa família destaca-se *Jatropha* L. encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo; no Brasil, são encontradas 23 espécies, sendo 10 endêmicas (BIGIO et al., 2020). Alguns estudos comprovaram o potencial farmacológico de espécies desse gênero: *Jatropha gossypifolia* apresenta atividades anti-infertilidade, anti-inflamatória, antidiarreica e analgésica (RANA et al., 2014); *J. gossypifolia* apresenta atividade antimicrobiana (FÉLIX-SILVA et al., 2018); *Jatropha curcas* apresenta atividade antifúngica (SAMA et al., 2021); e *Jatropha podagrica* apresenta atividade antitumoral contra células de osteosarcoma (YUAN et al., 2022).

Dentre as espécies de *Jatropha* L. destaca-se *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill., um arbusto de médio porte que teve algumas atividades já descritas, como efeito antibacteriano (ROCHA; DANTAS, 2009), antioxidante (MELO et al., 2010), hipotensor e estimulante dos músculos lisos do intestino e do útero (LEAL; AGRA, 2005). Porém, ainda são poucos os estudos ao que se referem à amplitude do seu potencial terapêutico e de segurança de uso, quanto aos parâmetros toxicológicos

A pesquisa com plantas medicinais representa uma estratégia relevante na busca por novos fármacos (AL-SNAFI et al., 2018; YATOO et al., 2018). Diante disso, tem crescido o

estudo de espécies botânicas com potenciais anti-inflamatório e analgésico e que apresentem o mínimo de efeitos colaterais, tendo em vista que, os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento da dor e inflamação (AINES, corticoides, opioides, etc.) possuem diversos efeitos colaterais. Por exemplo, cefaleia, distúrbios gastrointestinais, dores abdominais e insuficiência hepática são alguns dos sinais e sintomas que podem estar associados ao uso prolongado desses medicamentos (SOLIMAN et al., 2019; STOCKINGS et al., 2019).

Por outro lado, além da avaliação farmacológica, a avaliação dos efeitos tóxicos de espécies vegetais passa a ideia de que irá trabalhar com uma substância isolada é considerada importante, pois a exposição a produtos químicos, mesmo naturais, pode ser perigosa e levar a influências adversas no organismo. Muitas pesquisas publicadas se concentraram mais nos potenciais terapêuticos das plantas do que na toxicidade. Porém, há a necessidade de investigar essas plantas medicinais para melhor compreender suas propriedades, segurança e eficiência (NDHLALA et al., 2013; TARIQ et al., 2018). Na prática, a avaliação dos efeitos tóxicos normalmente inclui efeitos agudos, subagudos, crônicos, carcinogênicos e reprodutivos (OLIVEIRA et al., 2019). O teste de toxicidade aguda fornece informações valiosas sobre a toxicidade de uma substância nos órgãos, o metabolismo de um composto e os efeitos adversos em exposição a dose única, levando à seleção do nível de dose segura (COSTA et al., 2020).

A presente tese teve como objetivo avaliar a segurança de uso oral agudo do extrato hidroetanólico obtido de folhas de *J. mollissima*, através dos testes de toxicidade, bem como avaliar o potencial farmacológico no tratamento da dor e na cicatrização de feridas em camundongos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais têm se tornado cada vez mais populares nos últimos anos, mas seu uso é tão antigo quanto a própria civilização humana (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). Historicamente, a fitoterapia tem sido documentada na medicina ayurvédica chinesa, tibetana e indiana, com registros que datam de mais de 2.000 anos antes de Cristo, como a Pen Ts'ao e a coleção de fórmulas do Museu Pensilvânia. No Brasil esse conhecimento é originário principalmente de povos indígenas, quilombolas e ribeirinhos, sendo transmitido popularmente através de gerações (HELFAND; COWEN, 1990; BADKE et al., 2011; FIRMO et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que, para que uma planta seja considerada medicinal, ela deve possuir substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursoras de drogas semissintéticas (OMS, 1998). Essas substâncias produzidas pelo metabolismo vegetal são divididas em dois grupos: os metabólitos primários, que incluem aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídeos e clorofila responsáveis pela função, a fotossíntese, e a extração de nutrientes (SHIH; MORGAN, 2020) e os metabólitos secundários, tais como flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, açúcares redutores e terpenos dentre outros, que têm um papel essencial na defesa e proteção, na competição vegetal e na atração de organismos benéficos como polinizadores, repelem insetos herbívoros, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes, bem como na comunicação entre as espécies (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2017; BORGES et al., 2017). Devido à grande variedade de substâncias químicas bioativas, as plantas são uma excelente fonte para encontrar novos fármacos (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2019; SHIH; MORGAN, 2020).

Aproximadamente 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais como fonte terapêutica. As partes das plantas que são utilizadas variam de acordo com o tipo de uso, entretanto, as mais utilizadas são as folhas, cascas, raízes, látex, frutos e sementes (SILVA PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017). Estima-se que existam aproximadamente 500 milhões de espécies vegetais no mundo, sendo o Brasil um dos maiores depositários dessa biodiversidade. Apesar disso, o número de espécies vegetais estudadas é baixo quando comparado ao número total de espécies vegetais catalogadas (BUBALO et al., 2018). Apenas uma pequena percentagem desta biodiversidade tem sido estudada



fitoquimicamente e farmacologicamente, sendo a maior parte em estudos preliminares, que nem mesmo avaliam a segurança da sua utilização (SILVA et al., 2020).

Muitas vezes, a busca por plantas com potencial farmacológico é baseada no conhecimento etnobotânico da aplicação, teor químico e toxicologia, ou uma combinação desses critérios (SALEHI et al., 2019; CHEN et al., 2020). Esses estudos podem levar ao desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas que podem ser utilizadas na fitoterapia (ZHOU et al., 2018). O uso de plantas medicinais na rotina dos cuidados de saúde pode reduzir o custo com a saúde pública, por conseguinte os custos associados à fabricação e distribuição de medicamentos seriam minimizados. Sabe-se que, o uso de plantas medicinais é benéfico para a saúde humana desde que seu potencial terapêutico e de sua segurança sejam comprovadas experimentalmente (CHEN et al., 2018).

## 2.2 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE JUSS.

A família Euphorbiaceae é uma das maiores famílias botânicas encontradas no mundo, com aproximadamente 6000 espécies descritas dentro de pouco mais que 300 gêneros, estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, por exemplo, a família Euphorbiaceae possui 65 gêneros e cerca de 1.000 espécies diferentes, com uma grande variedade de habitats e comportamentos. Dentre as espécies encontradas no Brasil, 4 gêneros e 642 espécies são endêmicas (CAVALCANTI et al., 2020). Informações distintas da introdução.

É uma das famílias mais significativas da flora brasileira, além de uma das mais complexas taxonomicamente. Espécies de Euphorbiaceae são encontradas na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas e Pantanal, sendo apenas nos Pampas onde essa família não se encontra entre as mais ricas. Suas formas de vida podem variar desde subarbustos até enormes árvores. Já os substratos de crescimento incluem os mais diversos, como meio aquático, epífita, rupícola e terrícola. Uma de suas propriedades botânicas é a existência de compostos com propriedades medicinais, que podem estar presentes em um látex preto ou colorido que é visível quando a planta é submetida a traumas mecânicos, tendo muitas vezes alta toxicidade (CAVALCANTE et al., 2020; HE et al., 2021).

A morfologia das espécies pertencentes a essa família pode variar significativamente. As raízes são xilopódios ou tuberosas, com polpa amarela, branca ou creme. Por se apresentarem como ervas, arbustos, árvores ou trepadeiras, e por ocuparem diferentes habitats, com diferentes tipos de clima e solo, os caules destas plantas acabam apresentando uma grande

variedade morfológica. Já as folhas são geralmente alternas e espiraladas ou dísticas, simples, às vezes opostas, palmado-lobadas ou raramente compostas. As inflorescências são presentes, mas frequentemente muito modificadas, às vezes formando falsas flores. O fruto geralmente é esquizocárpico com deiscência elástica, raramente são bagas, drupas ou sâmaras. As sementes são frequentemente oblongas a ovais, ariladas ou com uma carúncula (GOVAERTS et al., 2000; VAN WELZEN, 2002; SSEGAWA, NKUUTU, 2006; SECCO et al., 2012).

De acordo com Souza e Lorenzi (2019), as euforbiáceas incluem diversas espécies de interesse econômico, como a seringueira (*Hevea brasiliensis*) utilizada na produção de borracha (NUVOLONI et al., 2020; NAIR, 2021). Os óleos essenciais de folhas, frutos, sementes de *Aleurites moluccana* e *Aleurites fordii* possuem aplicação na produção de tintas e vernizes (LENY et al., 2020; SUSILOWATI et al., 2020). Já *Sapium sebiferum* é usada para fazer cera e gordura vegetal (SHAH et al., 2020). A macaxeira (*Manihot esculenta*), conhecida popularmente como “aipim” ou “mandioca”, está entre as espécies de maior importância econômica por sua aplicação na culinária brasileira, sendo uma das mais importantes fontes de carboidratos nos trópicos (MUIRURI et al., 2021). As sementes de “mamona” (*Ricinus communis*) são ricas em óleo essenciais e ácidos graxos utilizados na cicatrização de feridas (YEBOAH et al., 2020; TRIPATHI et al., 2021).

Entre os principais efeitos terapêuticos relatados na literatura entre as espécies pertencentes a esta família estão: anti-inflamatórios, anticancerígenos e imunorreguladores (MOURA et al., 2019; CAVALCANTE et al., 2020). De acordo com ORELLANA-CUÉLLAR e colaboradores (2014) os efeitos tóxicos para algumas delas como: “purga de cavalo” (*Aleurites moluccana*), que apresenta toxicidade oral aguda na dose de 2.000 mg/kg, causando alterações nas células hepáticas binucleadas e hemorragia glomerular. Já a “Iguape nogueira” (*Joannesia princeps*) causa episódios de vômitos e diarreia (NISHIOKA et al., 1997) e o látex de algumas espécies, que causa lesões significativas na mucosa por ser uma substância cáustica (CASTILHO et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

### 2.3 O GÊNERO *JATROPHA* L.

Dentre os gêneros da família Euphorbiaceae está *Jatropha* L., descrito pela primeira vez em 1737 por Linnaeus, pertencente à tribo Joannesieae da família Euphorbiaceae possuindo cerca de 175 espécies. Originária da América tropical, as espécies de *Jatropha* estão distribuídas entre os trópicos e subtropicais (Figura 1), onde são tradicionalmente usadas na

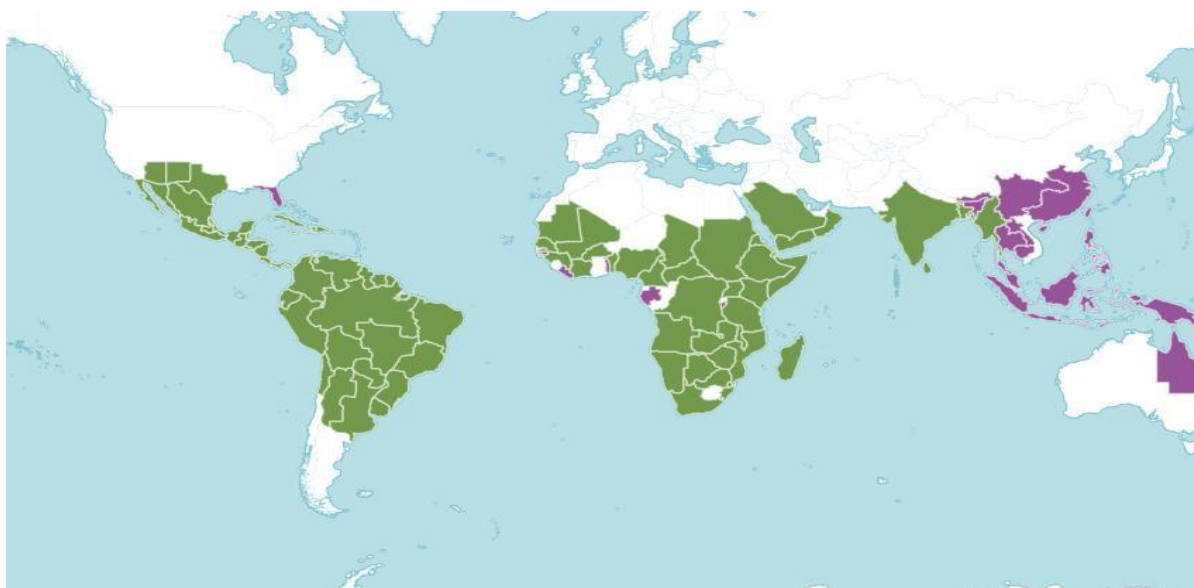
medicina popular para tratar diversas doenças. O nome “*Jatropha*” tem suas raízes na língua grega e seu significado está associado à finalidade medicinal, do grego, “*jatros*” significa “médico” e “*trophe*” significa “comida” (CORDEIRO et al., 2015; MARINHO et al., 2018; CHRISTENSEN et al., 2019).

No Brasil o gênero está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1), são encontradas 23 espécies no território brasileiro, dispersas (palavra popular) na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (CORDEIRO et al., 2015).

As espécies de *Jatropha* são consideradas plantas perenes e apresentam uma diversidade anatômica considerável, caracterizadas como arbustos, árvores e plantas suculentas. As folhas são alternadas, aglomeradas e fasciculadas ou frouxamente dispostas, cujas inflorescências são terminais ou axilares e o fruto é esquizocárpico, ovoide ou subgloboso com sementes ovoides ou oblongas e carunculadas (FÉLIX-SILVA et al., 2018; MARINHO et al., 2018; SAMA et al., 2021).

Várias espécies desse gênero têm sido estudadas quanto às suas propriedades farmacológicas e composição química, com destaque para *Jatropha curcas*, *Jatropha isabellei*, *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha integerrima* e *Jatropha macrorhiza*. Estudos farmacológicos do gênero *Jatropha* têm demonstrado correlações entre metabólitos secundários e diversas bioatividades, como antimicrobiana e antitumoral, (SAMA et al., 2021; YUAN et al., 2022).

Figura 1- Distribuição geográfica do gênero *Jatropha* L. Verde: espécies nativas; Roxo: espécies introduzidas.



Fonte: Plantas do mundo (2022).

O gênero é reconhecido como uma importante fonte de metabólitos secundários, como os terpenos. Em geral, as investigações da composição química de espécies de *Jatropha* levaram à identificação de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, peptídeos cíclicos, lignanas, neolignanas, sesquineolignas, flavonóides, cumarinas, lignanas cumarinas, alcalóides e ácidos eudesmenóicos (RANA et al., 2014; FÉLIX-SILVA et al., 2018; CAVALCANTE et al., 2020).

#### 2.4 *JATROPHA MOLLISSIMA* (POHL) BAILL.

*Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Figura 2), conhecida popularmente como “pinhão-bravo”, “pinhão-vermelho” ou “pinhão-roxo”, se apresenta como um arbusto, podendo atingir até 3 metros de altura. Com caule ereto, liso e pouco ramificado, a *J. mollissima* possui casca verde-cúpera, desprendendo-se de cor cinza-acastanhada quando seca. As folhas desta espécie são alternadas, suas flores apresentam coloração que variam do vermelho ao laranja, e os frutos têm formato de cápsulas verdes contendo três sementes castanho-escuro-avermelhadas (DEHGAN, 2012; CORDEIRO et al., 2015; IQBAL et al., 2021).

Figura 2- *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.



Fonte: Autora (2023).

Essa espécie não é considerada endêmica do Brasil, entretanto apresenta distribuição nos biomas Amazônia, Caatinga e Cerrado (Figura 3). É encontrada nas regiões Norte (Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais), além de ser encontrada na ilha oceânica de Fernando de Noronha (CORDEIRO et al., 2015).

Figura 3- Distribuição geográfica de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.



Fonte: Plantas do mundo (2021).

*Jatropha mollissima* é uma espécie rica em óleos fixos e suas sementes são utilizadas na produção de biodiesel (ASSIS; PORTO; AGRA, 2013). Alguns estudos realizados apresentam atividades biológicas dessa espécie. O látex apresenta atividade antibacteriana (ROCHA; DANTAS, 2009), o extrato metanólico das folhas apresenta atividade antioxidante (GOMES MELO et al., 2010). Já o óleo fixo das sementes registrou as atividades hipotensora e estimulante dos músculos lisos do intestino e do útero (LEAL; AGRA, 2005).

Iqbal et al. (2021) relataram a presença de alto teor de flavonóides, fenóis, taninos e saponinas em um extrato etanólico da folha de *J. mollissima*. Ainda, os autores avaliaram esse extrato quanto à toxicidade aguda (2.000 mg/kg) em ratos qual espécie *albinos wistar*, demonstrando a segurança toxicológica quanto ao seu uso em mamíferos, bem como, descreveram a capacidade de reverter a nefrotoxicidade induzida pelo medicamento cisplatina.

## 2.5 DOR

A dor é uma experiência mental, física e emocional, visando proteger o indivíduo de futuras lesões podendo ser aguda ou crônica. A dor aguda serve como um sinal de alerta de uma lesão tecidual ou outra condição que está se desenvolvendo ou pode se desenvolver; esse tipo de dor induz defesa, fuga ou remoção do agente causador. A dor crônica muitas vezes se estende além da ativação nociceptora, refletindo lesões ou alterações de longo prazo no sistema nervoso, e é composta por respostas musculoesqueléticas e psicocomportamentais (SOLIMAN et al., 2019; TREEDE et al., 2019; RAJA et al., 2020).

Na vida cotidiana, a dor tem um impacto significativo, por ser responsável pela diminuição da capacidade das atividades funcionais, uso excessivo de medicamentos, causando muitas vezes a incapacidade profissional, levando ao desemprego. Por outro lado, a dor serve como alarme de importância clínica, pois pode ser utilizada como diagnóstico primário em diversas patologias (NICHOLAS et al., 2019; RAJA et al., 2020).

A terapia analgésica é necessária para ajudar os pacientes a gerenciarem o desconforto causado pela dor. Porém, os medicamentos atualmente usados com ação anti-inflamatória e analgésica, como ácido acetil aleurítico, para aliviar a dor têm efeitos colaterais indesejados intrínsecos a doença cancerígena, e podem ter efeitos cumulativos desenvolvendo tolerância, sendo necessárias doses cada vez maiores para obter efeito terapêutico (SOUZA, 2021). O uso de plantas medicinais com propriedades analgésicas vem despertando a atenção das indústrias farmacêuticas e científicas. As ervas medicinais são usadas como analgésicos ou medicamentos antinociceptivos por cerca de 80% da população mundial (SOLIMAN et al., 2019; STOCKINGS et al., 2019; VAN DE DONK et al., 2019). Estudos vêm sendo comprovados com algumas espécies da família Euphorbiaceae, dentre elas, *Croton blanchetianus* e *Aleurites moluccanus*, apresentam atividade antinociceptiva através do extrato etanólico das folhas e extrato hidroalcoólico da casca respectivamente (FREITAS et al., 2020; SOUZA et al., 2021), *Ricinus communis* que proporciona atividade analgésica através de seus sesquiterpenos presentes óleos essenciais fixos dos extratos (FAROOQ et al., 2018).

## 2.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO E CICATRIZAÇÃO DE FERIDA

### 2.6.1 Ferida

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo a primeira barreira física de proteção a fatores externos e desempenha funções vitais para manter a homeostase do organismo, como o controle da perda hídrica e a invasão de agentes patogênicos, por exemplo, ácaros, fungos, bactérias etc. (BERNARDO et al., 2019). Sendo formada por duas camadas principais: epiderme e derme, a pele pode sofrer modificações ao longo do tempo e conseqüentemente ter suas funções fisiológicas estruturais alteradas (ARANTES et al., 2018; SZWED e SANTOS, 2015; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

As lesões na pele, podem ser causadas por fatores intrínsecos, tais como a invasão de microrganismos (bactérias e fungos), dermatoses, doenças vasculares e o aparecimento da acne, bem como aos fatores extrínsecos, como queimaduras, lesões por pressão em pacientes acamados, geralmente em decúbito dorsal e principalmente em pacientes diabéticos, o que pode causar desconforto e afetar a qualidade de vida (ARANTES et al., 2018).

Quando a integridade da pele é alterada por quaisquer dos fatores anteriormente citados, ou seja, qualquer interrupção classificada como deformidade ou lesão, pode ser definido como ferida. As feridas irão variar de acordo com a etiologia, tamanho e características, como fechada ou aberta, superficial ou profunda, simples ou complexa. Além disso, as feridas são classificadas em agudas ou crônicas (OLIVEIRA et al., 2019) ou de baixa, média ou alta complexidade, baseado em fatores como: tamanho, profundidade, bordas, maceração, tipo de tecido, presença de exsudato e sinais de inflamação ou infecção (CARVALHO et al., 2022).

As feridas agudas são causadas geralmente quando ocorre algum trauma, queimaduras ou processos infecciosos, vasculares, alérgicos e radioativos. Quando envolvem um processo de cicatrização mais simples, normalmente a restauração da função e anatomia é rápida, enquanto nas feridas crônicas, as alterações anatômicas e fisiológicas persistem por um período superior a três meses e estão ligadas a insuficiência vascular, isquemia, necrose e contaminação bacteriana, apresentando uma ou mais doenças com um processo de cicatrização lento e prolongado (MALAQUIAS et al., 2015; GONÇALVES, 2015).

## **2.6.2 Inflamação**

A inflamação começa quando o organismo é exposto a um dano ou agente agressor e como resultado, o corpo produz uma resposta ao dano tecidual. Esse dano pode ser causado por uma variedade de fatores, como infecções bacterianas, virais ou fúngicas, toxinas, necrose tecidual, isquemia, traumas, lesões físicas e químicas, objetos estranhos ou reações imunes

ligadas a hipersensibilidade e doenças autoimunes (PAHWA et al., 2018; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

As respostas inflamatórias podem assumir duas formas: agudas e crônicas. Essa classificação será baseada no tempo de duração da resposta e nas características que são observadas. Uma resposta aguda é definida após um evento traumático, de curta a média duração, com presença dos sintomas cardinais de rubor, edema e dor, bem como a presença de grande número de neutrófilos e macrófagos. Em uma resposta inflamatória crônica, há um agressor persistente e/ou exacerbação de mediadores inflamatórios, resultando na persistência da resposta por um longo período (HAMIDZADEH et al., 2017; SOEHNLEIN et al., 2017; PAHWA et al., 2018; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

Em resposta ao dano, o organismo inicia um processo de reparo rápido no local. O primeiro passo nessa resposta é reconhecer o agressor e, para isso, uma variedade de receptores celulares e proteínas circulatórias são capazes de reconhecer agentes que danificam as células e causam inflamação (BIANCHI et al., 2007; RANG et al., 2016), bem como uma variedade de moléculas que são liberadas ou alteradas em decorrência do dano (COSTA et al., 2012; RANG et al., 2016; SUGIMOTO et al., 2019).

A resposta inflamatória começa na área afetada e se estende a todo o organismo, com o objetivo de auxiliar na redução dos efeitos nocivos ao organismo, bem como promover adaptação morfofisiológica. Essa resposta começa com uma mudança na microcirculação local, resultando na migração de células sanguíneas e componentes plasmáticos para o espaço intersticial. Essa alteração vascular é desencadeada por uma variedade de células e derivados de proteínas plasmáticas (WALFORD; LOSCALZO, 2003; CASTANHEIRA; KUBES, 2019; COOKE, 2019).

Mastócitos, plaquetas, neutrófilos e monócitos/macrófagos participam desse processo de resposta e, sob a influência dessas células, uma variedade de mediadores químicos são liberados, que são responsáveis pela homeostase do organismo e participação direta na resposta inflamatória (HAMIDZADEH et al., 2017; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

Mediadores inflamatórios estimulam alterações vasculares e exsudativas na área infectada ou lesada, resultando em vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo visando maximizar o movimento de proteínas plasmáticas e leucócitos para fora da circulação. Este processo faz com que a área se torne mais avermelhada. Além disso, uma concentração extravascular aumentada de proteínas e resíduos celulares promove o desenvolvimento de edema (COSTA et al., 2012; RANG et al., 2016). A principal função dos leucócitos é eliminar



agressores e substâncias estranhas, bem como tecidos necróticos. Para realizar esse processo, são necessários leucócitos dos tipos neutrófilos e macrófagos, pois possuem a capacidade de fagocitose de corpos estranhos e tecidos danificados (JOHNSON III et al., 2017; DAVID; KUBES, 2019; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Além disso, os leucócitos estimulam a produção de citocinas e fatores de crescimento que auxiliam no mecanismo de reparo tecidual. Após a remoção de agentes agressivos e tecidos danificados, a resposta inflamatória começa a declinar. Há evidências de que o metabolismo do ácido araquidônico, leucotrienos pós-inflamatórios, lipoxinas anti-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias desempenham um papel nesse declínio (PARKER, 2017; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

As reações inflamatórias podem ter três desfechos. A resolução completa, implicando a remoção de restos celulares e de microrganismos, bem como a regeneração tecidual total. No caso da substituição tecidual, há um dano tecidual significativo com incapacidade de regeneração. Outra progressão da resposta inflamatória é a transição da inflamação aguda para crônica, que ocorre quando a inflamação aguda não pode ser resolvida e o agressor persiste, como nas artrites reumatóides (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019; NA et al., 2019).

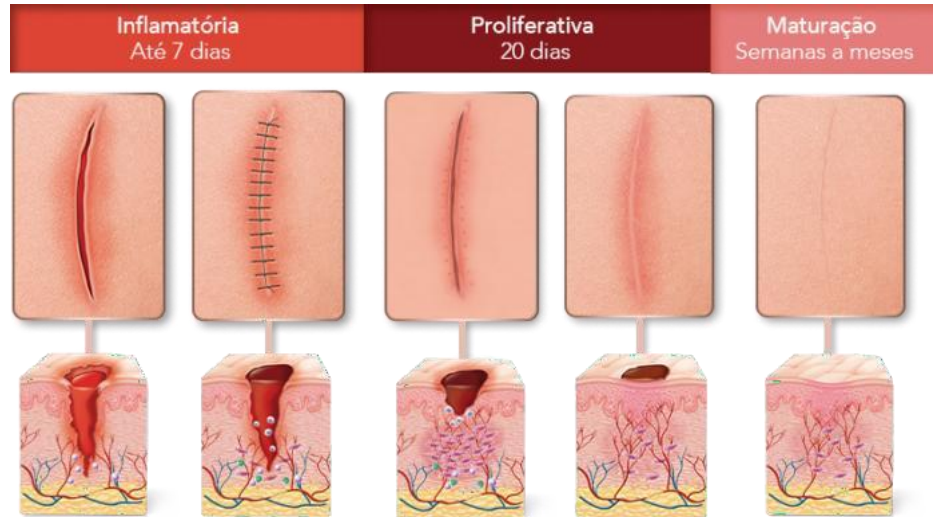
### **2.6.3 Cicatrização**

O reparo tecidual da pele é um evento caracterizado pela liberação de mediadores bioquímicos que atuam promovendo a cicatrização, a partir de reações celulares de reintegração da área lesionada, por meio da substituição do tecido de granulação (ferida) por tecido conjuntivo denso (cicatrizado). A fase inicial é a inflamatória, que pode durar até 7 dias, seguida da proliferativa e de remodelação (RODRIGUES et al., 2019).

Na fase 1, ocorre o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de transformação do crescimento beta ( $TGF-\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), interleucinas (IL-1 e IL-8) e interferon gama ( $IFN-\gamma$ ), desencadeando a quimiotaxia e diferenciação celular de monócitos para macrófagos. A segunda etapa está relacionada à fibroplasia, ou seja, a deposição de colágeno e a síntese de vasos sanguíneos (angiogênese), seguida pela formação do tecido de granulação e a reepitelização da pele, onde queratinócitos migram das bordas em direção ao centro. Por fim, na última fase, de remodelação, os fibroblastos estimulam a troca do colágeno tipo III pelo tipo I, restabelecendo

a força de contração das margens e funcionalidade do local lesionado, como ilustrado na Figura 4 (DABIRI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019).

Figura 4 - Aspectos superficiais e representações histológicas da pele de acordo com cada fase da cicatrização da ferida.



Fonte: <https://kelocote.com.br/entenda-as-cores-das-cicatrizes-e-o-que-elas-significam/> - Acesso em 20 de agosto de 2023.

As integrinas são os principais receptores de superfície celular que auxiliam no processo de reparo tecidual, atuando na adesão epidérmica e modulação das funções dos queratinócitos em todas as fases da cicatrização como, migração celular, proliferação e regeneração tecidual, além de auxiliar na indução do processo de angiogênese. Quando ocorre falha nesta modulação dos queratinócitos por integrinas, podem ocasionar feridas com cicatrizes hipertróficas ou processos crônicos (KOIVISTO et al., 2014; DIPERSIO et al., 2016). Os defeitos de reparo tecidual afetam principalmente pacientes imunossuprimidos, idosos, em tratamento de radioterapia ou quimioterapia e principalmente os indivíduos diabéticos, onde as feridas que não cicatrizam evoluem para úlceras e de acordo com a malignidade, podem progredir para o câncer do tecido fibrótico (QIANG et al., 2017).

Na fase inflamatória, o recrutamento e migração dos neutrófilos até a área lesionada, acontece durante um período de vinte horas durante a resposta inflamatória, ocorrendo a liberação das enzimas proteolíticas pelos neutrófilos, com o intuito de eliminar partes dos tecidos injuriados e evitar novas infecções. Como mecanismo de ampliação dessa resposta, liberam ainda citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e VEGF (SABINO e AUF DEM KILLER, 2015). A fase proliferativa é caracterizada pelos processos de proliferação

celular ou granulação, que incluem a formação de novo epitélio, vasos sanguíneos, tecido de granulação e fibroplasia, iniciando em torno do 4º dia após a lesão da pele, com a reepitelização caracterizada pela migração de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais saudáveis da borda da ferida para o centro, com o objetivo de refazer a barreira protetora. Um importante mediador dessa fase é o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) que é sintetizado por macrófagos, linfócitos T e mastócitos e atua na regulação de outras citocinas, sendo responsável pela estimulação da angiogênese, contribuindo com o fornecimento de nutrientes para a ferida, através dos novos capilares e permitindo a migração dos fibroblastos para a reconstituição dérmica a partir da deposição de colágeno (SIGNH et al, 2013; ABDEL-SALAM, 2014).

Durante a fase de remodelação, ou fase final do processo de cicatrização, o número de células na área ferida é reduzido, devido a indução do apoptose celular, a fim de restabelecer a homeostase tecidual. Conforme a matriz vai sendo remodelada, nota-se que a síntese de colágeno também diminui e logo os componentes dessa matriz são modificados e acontece a substituição do tecido e reorganização das fibras de colágeno (PITZ et al; 2016; KONDO, 2017; UDAYAKUMAR et al., 2017).

## 2.7 ESTUDOS DE TOXICIDADE

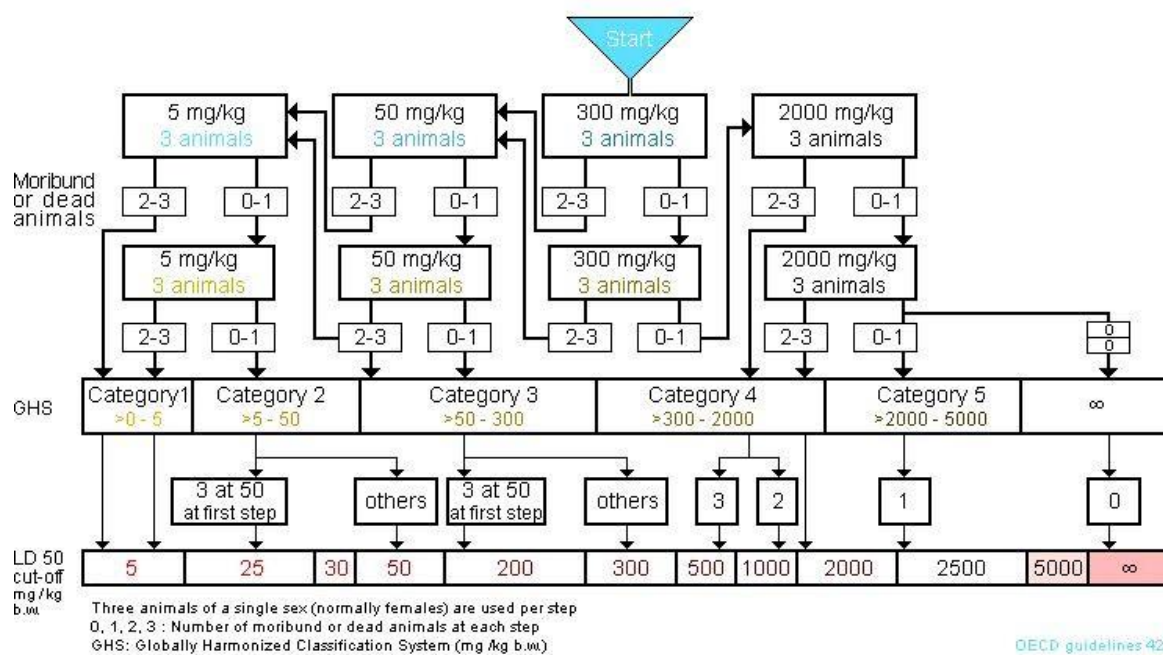
A toxicologia é a avaliação dos possíveis efeitos nocivos causados por uma substância específica dentro do corpo, que está ligada à sua concentração, duração e/ou forma de exposição (TONKENS et al., 2005; HARTUNG et al., 2020). As alterações causadas por substâncias tóxicas podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo da extensão dos danos causados, que podem ser moleculares, celulares ou teciduais, podendo resultar na morte do organismo. Essas alterações podem variar de acordo com as características do paciente, como sexo, idade, estado nutricional, entre outras (UGWAGH-OGUERJIOFOR et al., DEYNO et al., 2020)

Diversas agências reguladoras têm apresentado protocolos para a realização de testes toxicológicos, sendo o da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) um dos mais aceitos e seguido pelas principais agências reguladoras de medicamentos do mundo, incluindo a *Food and Drug Administration* (FDA), a Agência Médica Europeia (EMA), a Agência Reguladora de Medicamentos e Produtos de Saúde (MHRA) e o Ministério da Saúde do Japão. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também segue as diretrizes da OCDE (MOURA et al., 2012).

Os estudos de dose única, também conhecidos como testes toxicológicos rápidos ou agudos, permitem classificar um composto de acordo com seu nível de toxicidade ou letalidade, além de determinar a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ). Alterações no consumo de água, ração e massa corporal são observadas e os principais órgãos podem ser removidos ao final do experimento para avaliações macroscópicas e histopatológicas. A OCDE (2001) estabeleceu um procedimento com diretrizes para avaliação de toxicologia aguda em roedores afim de fornecer informações sobre os possíveis riscos à saúde que podem surgir da exposição repetida por um período relativamente limitado, incluindo efeitos nos sistemas nervoso, imunológico e endócrino (Figura 5).

Na avaliação seguindo o protocolo da OCDE, o nível de dose a ser usado como dose inicial é selecionado de um dos quatro níveis fixos: 5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corporal. A dose inicial deve ser aquela que tem maior probabilidade de produzir mortalidade em alguns dos animais dosados. Quando as informações disponíveis sugerem que a mortalidade é improvável no nível de dose inicial mais alto (2000 mg/kg de peso corporal), então deve ser usada essa dose. Quando não há informações sobre uma substância a ser testada, por razões de bem-estar animal, recomenda-se usar a dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal. Caso não seja observada nenhuma ou até 1 morte em uma dose de até 2000 mg/kg, o produto recebe a classificação de categoria 5.

Figura 5- Ensaio de avaliação de toxicidade aguda segundo o protocolo 423 da OECD.



Fonte: OECD (2001).

O objetivo dos testes toxicológicos é garantir a segurança do uso de determinada substância, estabelecendo limites seguros de aplicação e auxiliando no desenvolvimento de novos medicamentos (OLIVEIRA et al., 2019). A crença de que os produtos naturais não prejudicam a saúde leva a uma subestimação de sua toxicidade. Porém, experimentos mostraram que o uso de algumas espécies de plantas tem vários efeitos negativos no organismo animal, como *Achyranthes aspera*, *Chenopodium murale*, *Satureja punctata*, *Rumex abyssinicus* e *Aloe pulcherrima* (ALELIGN et al., 2020). Por isso, estudos toxicológicos envolvendo plantas medicinais devem ser realizados para avaliar sua segurança no uso (NDHLALA et al., 2013; TARIQ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; COSTA et al., 2020).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Analisar a caracterização fitoquímica e avaliar a toxicidade aguda, capacidade antioxidante *in vitro* e atividades antinociceptiva e cicatrizante de extrato hidroetanólico de folhas de *J. mollissima* em camundongos (*Mus musculus*).

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar metabólitos secundários presentes no extrato hidroetanólico de folhas de *J. mollissima* (JMLE, do inglês *J. mollissima leaf extract*) através da análise fitoquímica.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de JMLE.
- Determinar o potencial hemolítico *in vitro* de JMLE.
- Avaliar a toxicidade aguda de JMLE em camundongos Swiss albinos utilizando parâmetros comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos.
- Avaliar o efeito antinociceptivo de JMLE em diferentes modelos de indução de dor em camundongos, através dos testes de contorção abdominal, formalina, imersão de calda.
- Avaliar a atividade cicatrizante do tratamento com gel à base de JMLE em feridas experimentais em camundongos Swiss albinos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da presente tese estão apresentados na forma de artigos científicos.

### 4.1 ARTIGO 1 - *JATROPHA MOLLISSIMA* (POHL) BAILL. HYDROETHANOLIC LEAF EXTRACT HAS ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY WITHOUT SHOWING TOXICITY IN MICE

#### ***Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. hydroethanolic leaf extract has antinociceptive activity without showing toxicity in mice**

Geane Rodrigues Chaves<sup>1</sup>, Wêndeo Kennedy Costa<sup>1</sup>, Ewelyn Cintya Felipe dos Santos<sup>2</sup>, Magda Rhayanny Assunção Ferreira<sup>2</sup>, Luiz Alberto Lira Soares<sup>2</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>1</sup>, Alisson Macário de Oliveira<sup>1</sup>, Ivone Antônia de Souza<sup>3</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil*

<sup>2</sup>*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, Pernambuco, Brazil.*

<sup>3</sup>*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, Pernambuco, Brazil.*

#### **Introduction**

The Caatinga is a tropical dry forest region located in the Brazilian Northeast that shows a wide biodiversity, including several plants useful for the population for several purposes (SÁ-FILHO et al., 2021). Many plants from the Caatinga have been used in the commercial manufacturing of phytotherapeutic products (NASCIMENTO MAGALHÃES et al., 2019) and the researchers are looking for metabolites present in Caatinga species, aiming to scientifically prove their medicinal properties (SÁ-FILHO et al., 2021). *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail (Euphorbiaceae) is an endemic medicinal plant found at Caatinga and it is popularly known as “pinhão-bravo”. It is known for antibacterial (ROCHA; DANTAS, 2009; BRAQUEHAIS et al., 2016; QUEIROZ-NETO et al., 2019; BASTOS-CAVALCANTE et al., 2020), antiophidic

(VILAR et al., 2007; GOMES et al., 2016), antioxidant (MELO et al., 2010; IQBAL et al., 2021) antihelmintic (RIBEIRO et al., 2014), hemostatic (DANTAS et al., 2021), and nephrotoxicity-reversing (IQBAL et al., 2021) activities. Furthermore, the milky-looking sap (latex), which is produced during the stem injury of *J. mollissima*, has been used by the ancients for wound healing and for controlling hemorrhages, infections, and inflammations (QUEIROZ NETO et al., 2019).

The assessment of the toxic effects of a given substance is crucial, since the exposure to chemicals, even natural ones, can be dangerous and lead to adverse influences on the body. Thus, there is a need to investigate these medicinal plants to better understand their properties, safety and efficiency (NDHLALA et al., 2013; TARIQ et al., 2018). Acute toxicity testing provides valuable information about a substance's organ toxicity, compound metabolism, and adverse effects on single-dose exposure, leading to the selection of a safe dose level (COSTA et al., 2020). *J. mollissima* has not been assessed for its toxicity to *Mus musculus* mice yet.

The study of plants with anti-inflammatory and analgesic potentials have been stimulated aiming at find drugs with minimal side effects, considering that the drugs currently used for the treatment of pain and inflammation can promote several adverse reaction. For example, headache, gastrointestinal disorders, abdominal pain and liver failure are some of the signs and symptoms that may be associated with the prolonged use of these drugs (SOLIMAN et al., 2019; STOCKINGS et al., 2019).

Even though the antinociceptive activity of *J. mollissima* has not been reported yet, other species from the *Jatropha* genus have shown such property. For example, a dichloromethane fraction from *Jatropha isabellei* underground root parts displayed antinociceptive and antiedematogenic activities, representing a promising plant product for the arthritis treatment (FRÖHLICH et al., 2017). In addition, Aati and colleagues (2018) demonstrate that root dichloromethane fractions of *Jatropha pelargoniifolia* presented significant antinociceptive and anti-inflammatory effects.

This study aimed to evaluate the acute 1 toxicity in (*Mus musculus*) mice of a *Jatropha mollissima* hydroethanolic leaf extract (JMLE) and to investigate its *in vitro* 3 antioxidant and *in vivo* 2 antinociceptive activities.

## **Materials and methods**

### *Botanical authentication and extract preparation*



Plant material was collected period? morning or afternoon? in July 2020 in Caruaru, Add geographic coordinates city of Pernambuco, Brazil, with access registered (A648A31) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). A voucher copy (number 82,721) was deposited at the Geraldo Mariz herbarium of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). To prepare the extract, the leaves were washed and dried at 37 °C for five days air circulation laboratory oven. The leaves were crushed in a knife mill and the powder was added to a solution of Ethyl Alcohol P.A. A.C.S. ®: water distilled (1:1 v/v) in the proportion of 10% (w/v). Then, the mixture was processed in a turboextractor in four cycles of 30 s at intervals of 4 min and filtered through cotton. The extract obtained (JMLE) was concentrated in a rotary evaporator (50 °C) and then lyophilized.

#### *Phytochemical analysis*

##### *Thin layer chromatography (TLC)*

Thin-layer chromatography (TLC) was performed to screen the presence of the following compounds: cinnamic acid derivatives, flavonoids, tannins, coumarins, terpenes/steroids, saponins, anthracenic compounds, sugars, and alkaloids. Two milligrams of the JMLE was weighed and diluted in 2 mL of methanol, then taken to the sonicator for 10 min. The standard solutions were prepared at 0.5 mg/mL in methanol. The plates were developed in a high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) system (CAMAG, Switzerland), consisting of a Linomat V sample applicator equipped with a 100 µL syringe (Hamilton, Switzerland) connected to compressed air, and the winCATS® software (CAMAG, Switzerland). Silica gel plates (60-F254; Merck, Germany) were placed in a twin trough vertical glass chamber (10 × 10 cm, CAMAG, Switzerland), and the plates were developed using the mobile phase required for each compound class (MARKHAN, 1982; ABREU, 2000; WAGNER AND BLADT, 2001). The saturation time for the mobile phase was 30 min at 25 ± 2 °C. After development, the plates were derivatized by spraying with the reagents specific to each class compound and visualized under 254 or 365 nm ultraviolet light (MARKHAN, 1982; ABREU, 2000; WAGNER AND BLADT, 2001). The images were acquired using the MultiDoc-It™ Imaging System (Model 125, USA) with UVP software and a Canon camera (Rebel T3, EOS 1100 D).

### *High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)*

JMLE (1 mg) was dissolved in 1 mL of 50% methanol (HPLC grade; Tedia, USA) and then diluted in ultrapure water (Purelab 110 Classic UV, ELGA LabWater, USA) and filtered (PVDF filter, 0.45  $\mu\text{m}$ ; Chromafil) for vials. The vitexin and caffeic acid standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were prepared in 50% methanol. The analysis was conducted on an HPLC UltiMate™ 3000 system (Thermo Fisher Scientific, USA) coupled to a Diode Array Detector (DAD; Thermo Fisher Scientific) and equipped with a binary pump (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), a degasser, and an autosampler with a loop of 20  $\mu\text{L}$  (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). The wavelengths of 210, 270, and 350 nm were used for detection. The chromatographic separations were achieved with a C18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm i.d., particle size 5  $\mu\text{m}$ ; Dionex, USA) equipped with a guard column (C<sub>18</sub>, 4 mm  $\times$  3.9  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, USA). The separations were performed at a temperature of  $25 \pm 2$  °C. The mobile phase consisted of purified water (A) and methanol (B), both acidified with 0.05% trifluoroacetic acid and degassed in an ultrasound bath (Ultracleaner 1600A, Unique®), at a flow rate of 0.8 mL/min. A gradient program was applied as follows: 0–10 min, 5–20% B; 10–14 min, 20–25% B; 14–18 min, 25–40%B; 18–25 min, 40–80%B; 25–30 min, 80%B; 30–34 min, 80–5%B; 34–36 min, 5%B. For data analysis and processing, the software Chromeleon™ version 6 123 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, USA) was used.

### *Phenol and flavonoid contents*

The total phenol content was estimated using the Folin-Ciocalteu method (SINGLETON; ROSSI, 1965), with some modifications. Samples of 20  $\mu\text{L}$  of JMLE (1 mg/mL) were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of the Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min at 25 °C, 80  $\mu\text{L}$  of a sodium bicarbonate solution (0.7 M) was added. The reaction was kept in the dark for 2 h at 25 °C. The absorbance was measured at 735 nm. Methanol was used as negative control. Gallic acid (10–100  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as standard, and the results were expressed as mg equivalent of gallic acid per gram of extract (GAE/g extract). The experiment was done in triplicate.

The flavonoid content was determined according to the colorimetric method of aluminum chloride (WOISKY; SALATINO, 1998). JMLE was tested at the concentration of 1 mg/mL, and quercetin was used to obtain the standard calibration curve (10–100  $\mu\text{g/mL}$ ). The sample (100  $\mu\text{L}$ ) was mixed with 100  $\mu\text{L}$  of the reagent [2% aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) in

methanol] after 1 h in a dark at 25 °C, the absorbance at 420 nm was read against a blank of methanol. The results obtained were expressed as mg equivalent to quercetin per gram of extract (mg QE/g extract). The experiment was done in triplicate.

#### *Antioxidant activity*

##### *Total antioxidant capacity (TAC)*

Sample (100 µL) of JMLE (31.25 to 1000 µg/mL) or ascorbic acid (31.25 to 1000 µg/mL) was added to 1 mL of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The assays were incubated at 95 °C for 90 min, then cooled to 25 °C and the absorbance was read at 695 nm. The control reaction consisted of 100 µL of methanol mixed with 1 mL of the reagent solution. The total antioxidant capacity (TAC) of JMLE was calculated as relative antioxidant activity in relation to ascorbic acid, calculated by the formula:

$$\text{TAC\%} = [(A_a - A_c) / (A_{aa} - A_c)] \times 100,$$

Where  $a_a$  is the absorbance of the sample,  $A_c$  is the absorbance of the control and  $A_{aa}$  is the absorbance of ascorbic acid (AGUILAR; PINEDA; PRIETO, 2013).

##### *DPPH scavenging assay*

For evaluation of the ability to scavenge the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical, an aliquot of 40 µL of JMLE at different concentrations (31.25 to 1000 µg/mL) was mixed with 250 µL of 1 mM DPPH solution (in methanol) for 25 min at 25 °C and protected from the light. Ascorbic acid was used as a positive control, and methanol was the negative control. The absorbance of each solution was measured at 517 nm. The inhibition percentage (I%) was calculated using the following equation:

$$\text{I\%} = [(A_c - A_s) / (A_c)] \times 100$$

where  $A_c$  is the control absorbance and  $A_s$  is the sample absorbance (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995). The concentration of JMLE responsible for scavenging 50% of DPPH ( $IC_{50}$ ) was calculated through linear regression.

#### *ABTS assay*

The  $ABTS^+$  (2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)) radical was obtained by mixing 5 mL of an ABTS solution (7 mM) with 88  $\mu$ L of 140 mM potassium persulfate solution. This mixture remained in the dark and at 25 °C for 16 h before use. The  $ABTS^+$  solution was diluted with ethanol until an absorbance of 0.7 nm ( $\pm$  0.02) at 734 nm. Samples (10  $\mu$ L) of JMLE (31.25 to 1000  $\mu$ g/mL) were mixed with 1 mL of the  $ABTS^+$  radical for 6 min and then absorbance at 734 nm was read. Ascorbic acid was used as positive control and inhibitory activity was calculated based on the percentage of  $ABTS^+$  removed:

$$\% = [(A_c - A_s) / (A_c)] \times 100,$$

where  $A_c$  is the absorbance of the control and  $A_s$  is the absorbance of the sample (RE et al., 1999). The concentration of JMLE that cause 50% inhibition of  $ABTS^+$  ( $IC_{50}$ ) was calculated through linear regression.

#### *Hemolytic assay*

Hemolytic activity of JMLE was evaluated according to Costa et al. (2020). The mice blood was centrifuged at 3000 rpm for 6 min, the supernatant was discarded, and the pellet was washed three times with phosphate-saline buffer and resuspended with the same solution. In a test tube, 1.1 mL of erythrocyte suspension and 0.4 mL of the extract in concentrations from 0.25 to 10.0 mg/mL were incubated for 60 min. Next, the assays were centrifuged, and the supernatants were used to evaluate hemoglobin release by measuring the absorbance at 540 nm. Hemolytic activity was expressed in relation to the activity of Triton X-100 (positive control) and calculated using the following formula:

$$\text{Hemolytic activity (\%)} = (A_s - A_b) \times 100 / (A_c - A_b),$$

$A_b$  is the absorbance of the negative control (blank without extract) and  $A_c$  is the absorbance of the positive control (Triton X-100).

### *Animals*

Mice (*Mus musculus*) were obtained from the Instituto Keizo Asami (iLIKA). The assays were approved by the Ethics Committee for Animal Use of UFPE (process no. 0014/2020). The animals were maintained standard conditions (12:12 light: dark cycle,  $22\pm 1$  °C) with ad libitum access to food and water.

### *Oral acute toxicity*

The acute toxicity assay was performed following the protocol 423 of the Organization for Economic Co-operation and Development (2002) with some modifications it is important to say which six female nulliparous Swiss albino mice (*Mus musculus*) at eight weeks of age were average weight distributed in two groups of three animals: a control group and a JMLE-treated group. The control group received orally distilled water (vehicle) in the proportion of 100  $\mu$ L for each 10 g of body weight. The animals in the JMLE-treated group received the extract orally at a dose of 2000 mg/kg of the hydroalcoholic proportion. The animals had fasted for 4 h before and 2 h after the extract or vehicle administration. However, they had free access to water.

During 60 min after administration, behavioral signs related to the central such as signs of motor coordination, aggression, and cardiac arrest, among others (CNS) and autonomic, depressants and diuretics, e.g. (ANS) nervous systems were evaluated. After this period, the animals were monitored every 24 h for 14 days. During two weeks, weight, water intake, and food consumption were measured. At the end of 14 days, anesthetized and then euthanized was performed, and blood samples were taken by cardiac puncture for hematological and biochemical parameters. In addition, kidney, liver, spleen and lung were removed for macroscopic and microscopic evaluations. Sections of the organs were fixed in buffered formalin (10%, v/v), dehydrated through a graded ethanol series (70–100%), diaphanized in xylol, and embedded in paraffin. Histological slices (5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin-eosin and mounted using cover slips.

### *Antinociceptive activity*

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

The assay was performed according to Oliveira et al. (2018). Male Swiss mice (n=6) were treated with JMLE (50, 100 or 200 mg/kg *per os*) 1 h before intraperitoneal injection (0.1 mL/10 g) of 0.85% (v/v) acetic acid. Morphine (10 mg/kg i.p.) and indomethacin (20 mg/kg i.p.) were used as positive controls and administered 30 min before the acetic acid injection. The number of contortions was measured from 5 to 15 min after acetic acid administration in all groups.

#### *Formalin-induced nociception*

The test was conducted based on Hunskaar and Hole (1987). Briefly, male Swiss mice (n=6) were pretreated orally with JMLE (50, 100 or 200 mg/kg) 1 h before the injection of 20  $\mu$ L of formaldehyde (10% in PBS, v/v) on the right hind leg. Morphine (10 mg/kg i.p.) and indomethacin (20 mg/kg i.p.) were used as positive controls and administered 30 min before the formaldehyde injection. Paw licking time was evaluated in two phases: 1st phase (neurogenic pain) from 0 to 5 min and 2nd phase (inflammatory pain) from 15 to 30 min.

#### *Tail immersion test*

The tail immersion test was performed according to Khatun et al. (2015). Male Swiss mice had their tails immersed in warm water ( $55 \pm 1$  °C). The ones that removed their tails in less than 5 s were selected and randomly divided into 5 groups (n=6 per group). The animals were pretreated orally with JMLE (25, 50 or 100 mg/kg) and intraperitoneally with morphine (10 mg/kg) or vehicle (0.9% NaCl, 0.1 mL/10g) and had their tails immersed in warm water (55 °C) up to 20 s at times 0, 30, 60, 90 and 120 min after the treatments. The latency time for a discomfort reaction was recorded, not exceeding 20 s. Animals with a latency of 20 s were considered to have complete analgesia.

### *Mechanisms of antinociceptive activity*

To assess putative antinociceptive mechanisms, the animals were pre-treated intraperitoneally with naloxone 2 mg/kg (non-selective opioid receptor antagonist), or glibenclamide 5 mg/kg (channel blocker K). Subsequently, the animals were treated with JMLE (200 mg/kg *per os*), saline solution (*per os*) or morphine (10 mg/kg i.p.) and were submitted to the formalin test.

### *Statistical analysis*

The results obtained were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and were analyzed using GraphPad PRISM® version 8.0. Data were compared and statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) or linear regression, where P values  $<0.05$  were considered statistically significant.

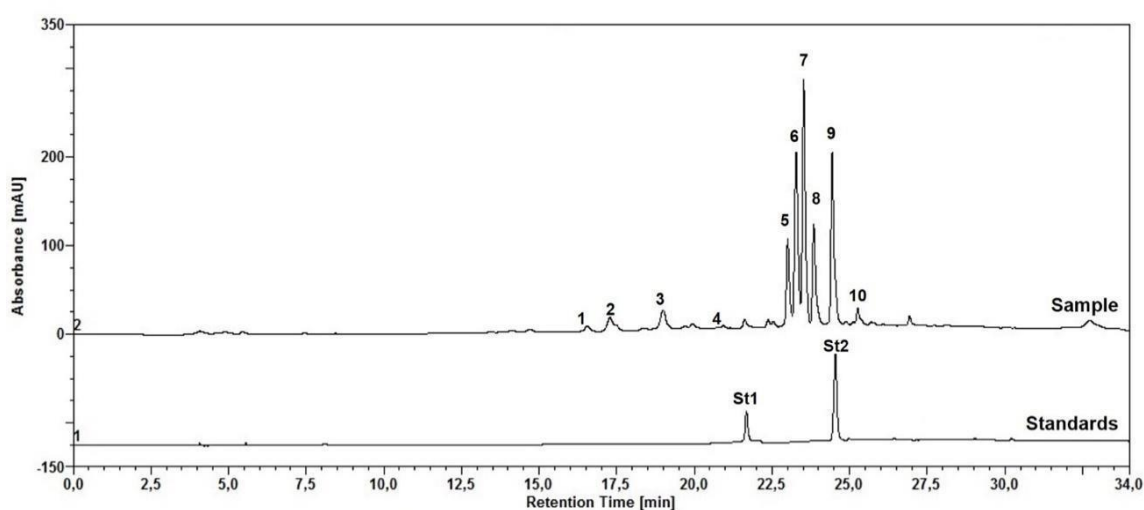
## **Results and discussion**

Popular interest in the use of medicinal plants has grown considerably and studies on the chemistry and pharmacology of natural products might lead to less expensive and more accessible health treatments, mainly in developing countries. Therefore, this work evaluated the toxicity of an ethanolic extract from leaves of *J. mollissima* (JMLE) and its antioxidant and antinociceptive activities.

In the phytochemical screening of JMLE by TLC, the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, saponins, reducing sugars and terpenes was revealed. Alkaloids, coumarins, anthracene derivatives, hydrolysable tannins, and condensed tannins were not detected. JMLE showed a high content of phenolic ( $620.63 \pm 1.47$  mg GAE/g) and flavonoid ( $22.55 \pm 0.55$  mg QE/g) compounds. Iqbal et al. (2021) reported the presence of high content of flavonoids, phenols, tannins and saponins in an ethanolic extract from *J. mollissima* leaf. However, differently of JMLE, triterpenoids, steroids and anthocyanins were not detected. These differences may be due to distinct methods of extraction: here it was used a 1:1 (v/v) ratio of ethanol:water while Iqbal et al. (2021) employed a 70:30 (v/v) ethanol: water solution. In addition, JMLE was obtained with a 10% proportion of plant drug/solvent while these authors used an approximately 0.25% proportion.

From these results, HPLC analysis was performed by monitoring the profile at a wavelength of 270 nm for the detection of flavonoids (Figure 1). In the HPLC fingerprint of the extract, it was possible to observe 10 peaks. The peaks 5, 6, 7, 8, 9 and 10 corresponded to flavonoids, while peaks 1, 2 and 4 corresponded to cinnamic derivatives, according to the scanning spectra (Figure 2). Vitexin was detected in peak 9 in comparison with the standard profile. The vitexin content was calculated as  $1.104 \text{ g\%} \pm 0.0028$ .

Figure 1- A representative profile of *Jatropha mollissima* leaf extract (JMLE) on high performance liquid chromatography (HPLC) using a C18 column. Standards: St1 - caffeic acid; St2 – vitexin.



Fonte: Autora (2023).

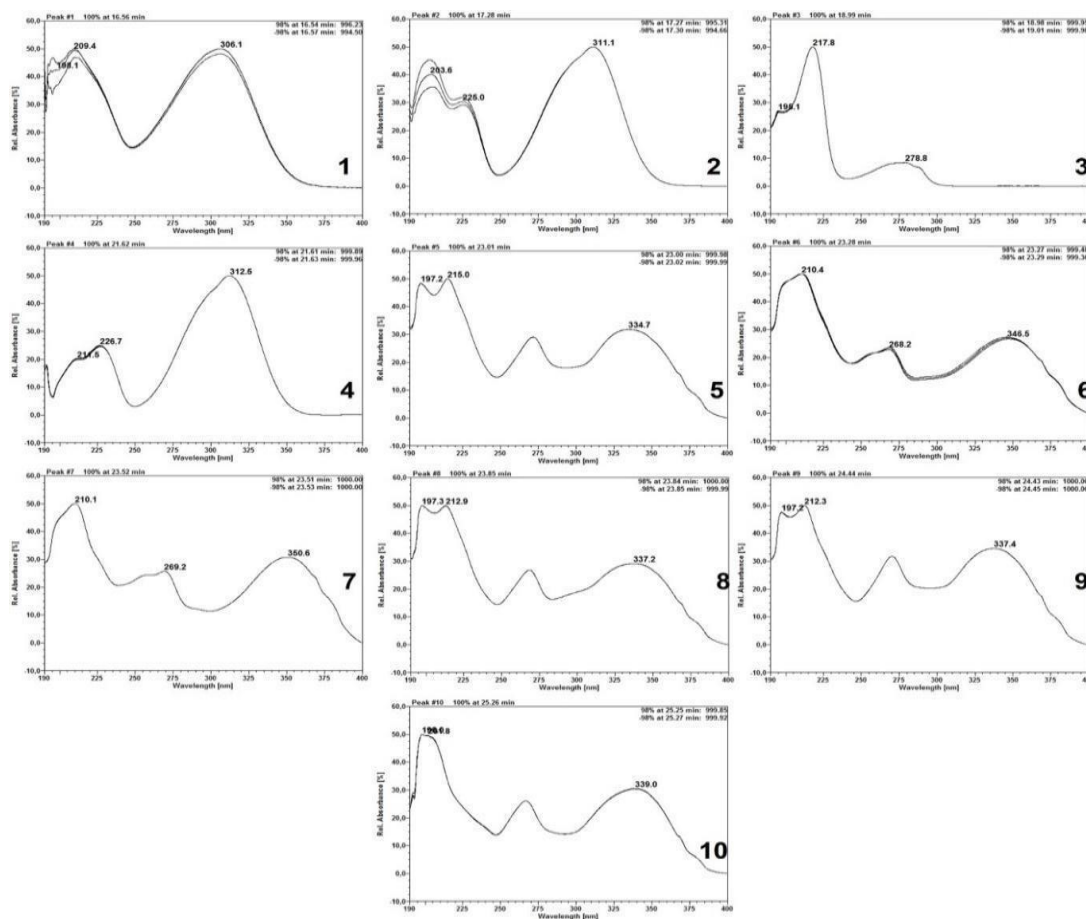
JMLE was evaluated for total antioxidant capacity (TAC) by the phosphomolybdenum method and the result showed an  $IC_{50}$  of  $123.4 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ . In the DPPH and  $ABTS^+$  scavenging assays, JMLE presented  $IC_{50}$  of  $87.84 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$  and  $49.08 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The standard ascorbic acid showed  $IC_{50}$  in the DPPH, and  $ABTS^+$  assays of  $12.74 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$  and  $72.54 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively.

A strong antioxidant activity has been associated with the high content of many phytochemicals such as flavonoids, phenols, tannins, and saponins. Flavonoids must play a role in JMLE antioxidant activity, since they have the capacity to scavenge free radicals, and some of them have enough antioxidant activity to outperform recognized antioxidants like vitamins A and E (SHEN et al. 2022). The antioxidant potential and the high flavonoids content in the JMLE may suggest possible pharmacological properties of this plant, such as antinociceptive action. Studies have shown a link between antioxidant and antinociceptive activity, indicating



that plant extracts containing antioxidants may alleviate pain (RAUF et al., 2016; DIAS et al. 2020; GOMES et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022).

Figure 2- The ultraviolet absorption spectra of the 10 peaks detected in performance liquid chromatography (C18 column) of the *Jatropha mollissima* leaf extract (JMLE).



Fonte: Autora (2023).

Iqbal et al. (2021) evaluated an ethanolic extract from *J. mollissima* leaves for acute toxicity (2000 mg/kg) and the ability of reversing cisplatin-induced nephrotoxicity in rats and demonstrated the safety of this extract for the animals. However, as discussed above, JMLE contains classes of secondary metabolites that were not detected in the extract studied by these authors. Thus, we examined the acute toxicity of JMLE in mice before testing its antinociceptive effects.

Regarding the toxicity evaluation, JMLE caused hemolysis of 18.16% at the highest concentration tested (10 mg/mL). This finding showed that JMLE has low hemolytic activity (COSTA et al., 2020). In the acute oral toxicity assay, behavioral signals of motor coordination,

aggression and cardiac arrest, for example were not altered in the mice of control and JMLE-treated groups observed for 14 days. There were no changes in weight and consumption of water and food in the group treated with the JMLE comparing with control (Table 1). Iqbal et al. (2021) reported that the ethanolic extract of *J. mollissima* leaves at 2000 mg/kg did not cause mortality of mice.

Table 1 - Evaluation of food and water consumption and weight average of animals from control group and treated with the *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) at 2000 mg/kg.

Treatments	Parameters		
	Weight average	Food consumption	Water consumption
Control	31.06 ± 0.98	23.35 ± 0.78	35.09 ± 1.45
JMLE (2.000 mg/kg)	30.88 ± 1.37	23.86 ± 1.05	34.53 ± 1.24

Values represent the mean ± SEM (n=5/group). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were found.

Fonte: Autora (2023).

The blood of control and JMLE-treated animals was evaluated in terms of hematologic and biochemical parameters and the results are presented in Tables 2 and 3, respectively. None of hematologic parameters of the animals exposed to the extract showed a significant difference ( $p > 0.05$ ) from the control. In the biochemical analysis, the animals treated with JMLE showed significant reduction ( $p < 0.05$ ) in tryglicerides, LDL and VLDL levels and an increase ( $p < 0.05$ ) of HDL level in relation to the control animals.

Table 2 - Hematological parameters of mice from control group or treated with the *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) at 2000 mg/kg.

Parameters	Treatments	
	Control	JMLE
Erythrocytes ( $10^6/\text{mm}^3$ )	5.65±0.42	5.40±0.50
Hematocrit (%)	37.31±2.20	38.13±2.32
Hemoglobin (g/dL)	14.12±0.51	14.33±0.48
Mean corpuscular volume (%)	49.20±2.14	48.36±2.51
Mean corpuscular hemoglobin (%)	18.10±0.36	17.92±0.43
Mean corpuscular hemoglobin concentration (%)	36.41±1.54	35.85±1.47
Platelets ( $10^3/\text{mm}^3$ )	956.32±55.49	845.94±60.21
Leukocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ )	7.43±0.83	7.19±0.63

Segmented (%)	65.38±3.45	63.96±3.28
Lymphocytes (%)	29.34±0.76	28.96±0.64
Monocytes (%)	3.29±0.42	3.31±0.37
Basophiles (%)	0.11±0.04	0.14±0.05
Eosinophiles (%)	1.72±0.24	1.55±0.20

Values represent the mean ± SEM. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were found.

Fonte: Autora (2023).

Table 3 - Biochemical parameters of blood of mice from control group and treated with the *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) at 2000 mg/kg.

Parameters	Treatments	
	Control	JMLE
Albumin (g/dL)	38.13±2.24	40.02±3.26
Alanine aminotransferase (U/L)	67.21±3.20	69.34±3.37
Aspartate aminotransferase (U/L)	101.42±4.22	104.25±5.35
Alkaline phosphatase (U/L)	15.10±0.85	15.27±0.63
Billirubin (mg/dL)	0.44±0.10	0.41±0.07
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	14.32±0.42	14.82±0.64
Total protein (g/dL)	70.34±2.49	71.43±2.31
Urea (mg/dL)	0.35±0.08	0.41±0.10
Creatinine (mg/dL)	4.14±0.60	4.01±0.42
Total cholesterol (mg/dL)	76.32±3.51	75.25±4.21
Triglycerides (mg/dL)	94.32±3.54	84.26±3.20*
High-density lipoprotein-cholesterol (mg/dl)	44.12±2.44	47.34±2.62*
Low-density lipoprotein-cholesterol (mg/dl)	26.82±2.07	21.45±2.32*
Very low- density lipoprotein-cholesterol (mg/dl)	18.07±1.30	15.66±1.07*

Values represent the mean ± SEM. \*) indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) in comparison with control.

Fonte: Autora (2023).

Table 4 shows the relative weights of the organs of the mice. Kidneys, liver, spleen and lungs did not show a significant difference in weight between JMLE-treated and control animals, LD<sub>50</sub> 2.500 mg/kg, ( $p > 0.05$ ). The histological investigation (Figure 3) revealed that control and extract-treated groups had intact architecture of all of the organs evaluated. Based on all the acute toxicity data, and according to the classification of the Globally Harmonized

System of Classification and Labeling of Chemicals, the extract can be classified as Category 5 (low toxic or non-toxic) (OECD, 2001).

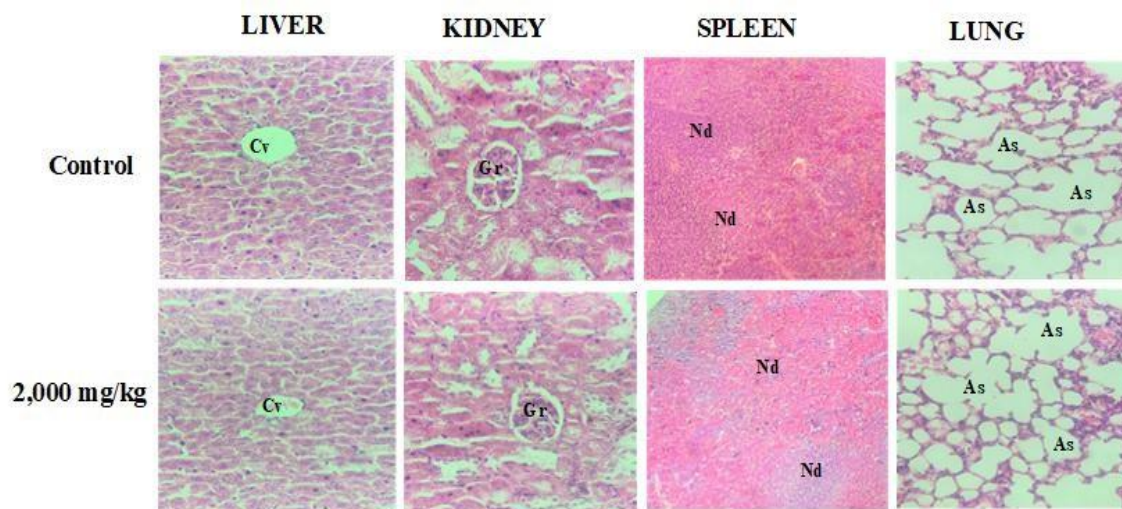
Table 4 - Evaluation of the relative organs weight (g/10 g animal body weight) from control group and treated with the *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) at 2000 mg/kg.

Treatments	Relative organs weight (g/10g)			
	Kidney	Spleen	Lung	Liver
Control	0.74±0.08	0.36±0.03	0.68±0.06	2.87±0.16
JMLE	0.70±0.05	0.39±0.04	0.64±0.05	2.68±0.20

Values represent the mean ± SEM (n=5/group). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were found.

Fonte: Autora (2023).

Figure 3 - Representative photomicrographs of the liver, kidney spleen and lung of mice from the control group and the groups treated with *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) at 2000 mg/kg. Liver: the centrilobular vein (cv) is seen in all images. Kidney: Renal glomeruli (Gr) and contorted tubules without alterations visible. Spleen: Lymph nodes (Nd) are well defined in the control and treated groups. Lung: Alveolar sac (As) can be visualized, with preserved architecture. Hematoxylin-eosin staining was used. Magnification: 400 × for liver, kidney and lung, 100 × spleen.

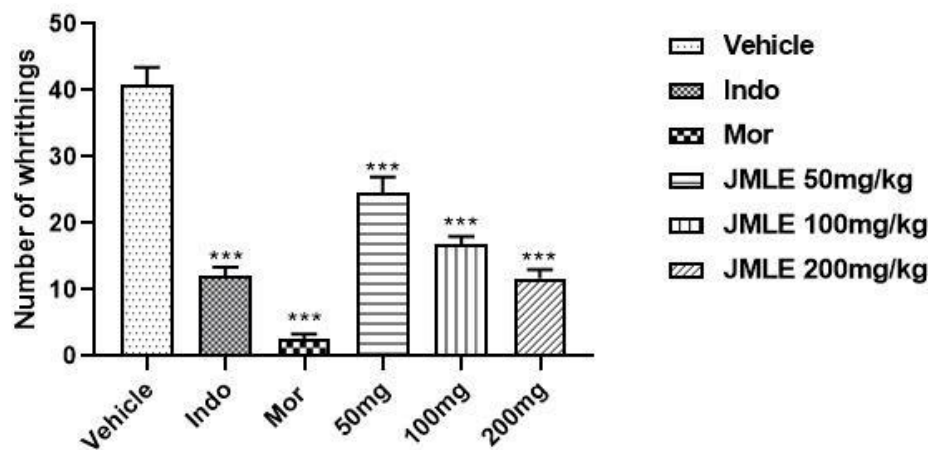


Fonte: Autora (2023).

Once defined the safety of the acute administration of JMLE to mice, the antinociceptive activity of the extract was evaluated. In the first test, the doses of 50, 100, and 200 mg/kg of JMLE reduced the number of writhings contorções by 40.41, 58.77, and 71.42%, respectively (Figure 4). Indomethacin and morphine caused a reduction of 70.61 and 93.87%, respectively. The acetic acid, when administered intraperitoneally, induces the release of pain

mediators, such as prostaglandins, glutamate, substance P, nitric oxide, histamine, and bradykinin. This assay is a very representative strategy for screening new pharmacological targets for pain relief. However, since the activation of various nociceptors occurs, it is a nonspecific test regarding the pharmacological pathways involved (Costa et al., 2022). Thus, formalin and tail immersion tests were conducted to investigate the involvement of central, peripheral or both components in the JMLE action.

Figure 4 - Antinociceptive effect of *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) on acetic acid-induced abdominal writhings. Vehicle: saline, 0.1 mL/10g. Mor: morphine, 10 mg/kg i.p. Indo: indomethacin 20 mg/kg i.p.. Each column represents the mean (n = 6) and asterisks indicate a significant difference from the control. \*\*\* p < 0.001 (ANOVA followed by Dunnett's test).



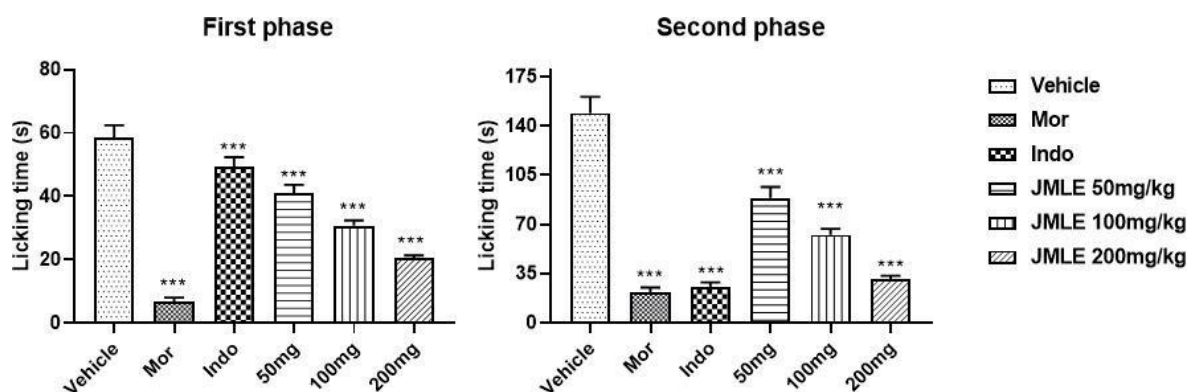
Fonte: Autora (2023).

The results of the formalin test are shown in Figure 5. In the first phase (neurogenic), JMLE at doses of 50, 100, and 200 mg/kg reduced the licking time by 30.19, 47.58, and 65.24%, respectively (Figure 5A). Indomethacin and morphine reduced the licking time by 15.67% and 88.31%, respectively. In the second phase (inflammatory), the extract reduced the licking time by 40.49, 58.05, and 79.30% at 50, 100, and 200 mg/kg, respectively (Figure 5B). The standard drugs indomethacin, and morphine reduced licking time in 85.46 and 83.22%, respectively (Figure 5B). These results showed that JMLE acted in both phases with dose-dependent action.

Aiming to investigate the mechanisms of action involved, naloxone, an opioid antagonist, and glibenclamide, a K<sup>+</sup> channel blocker, were administered to mice before JMLE and then formalin test was performed. The results are represented in Figure 6. In the first phase, naloxone administration inhibited the effect of JMLE (200 mg/kg) in 65.54% (Figure 6A),

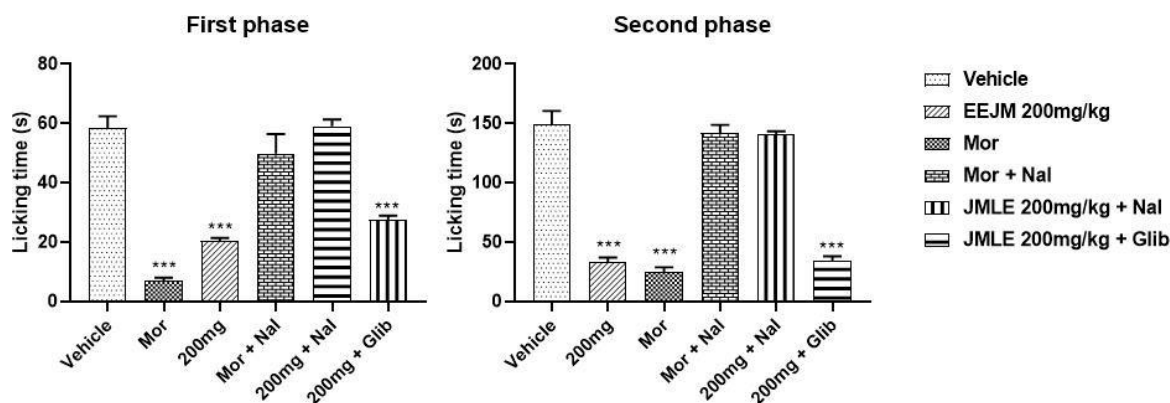
while morphine had its effect inhibited in 86.26%. In the second phase, JMLE (200 mg/kg) and morphine had their antinociceptive effects inhibited in 76.72 and 86.39%, respectively, when animals were pre-treated with naloxone. Glibenclamide did not inhibit the antinociceptive effect of the extract in both phases of the formalin test.

Figure 5 - Antinociceptive effect of *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) on both phases of the formalin assay. Morphine (Mor, 10mg/kg, i.p.) and indomethacin (Indo, 20mg/kg) were used as reference drugs. Vehicle: NaCl 0.9%. Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by the Bonferroni test. The asterisk (\*\*\*) indicates  $p < 0.001$  when compared to vehicle-treated mice.



Fonte: Autora (2023).

Figure 6 - Investigation of mechanisms of antinociceptive activity of *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) in the formalin test. The animals were pre-treated with naloxone (Nal, 2 mg/kg) or glibenclamide (Glib, 5 mg/kg) and subsequently treated with JMLE at 200 mg/kg. Results are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by the Bonferroni test. The asterisk (\*\*\*) indicates  $p < 0.001$  when compared to vehicle-treated mice.

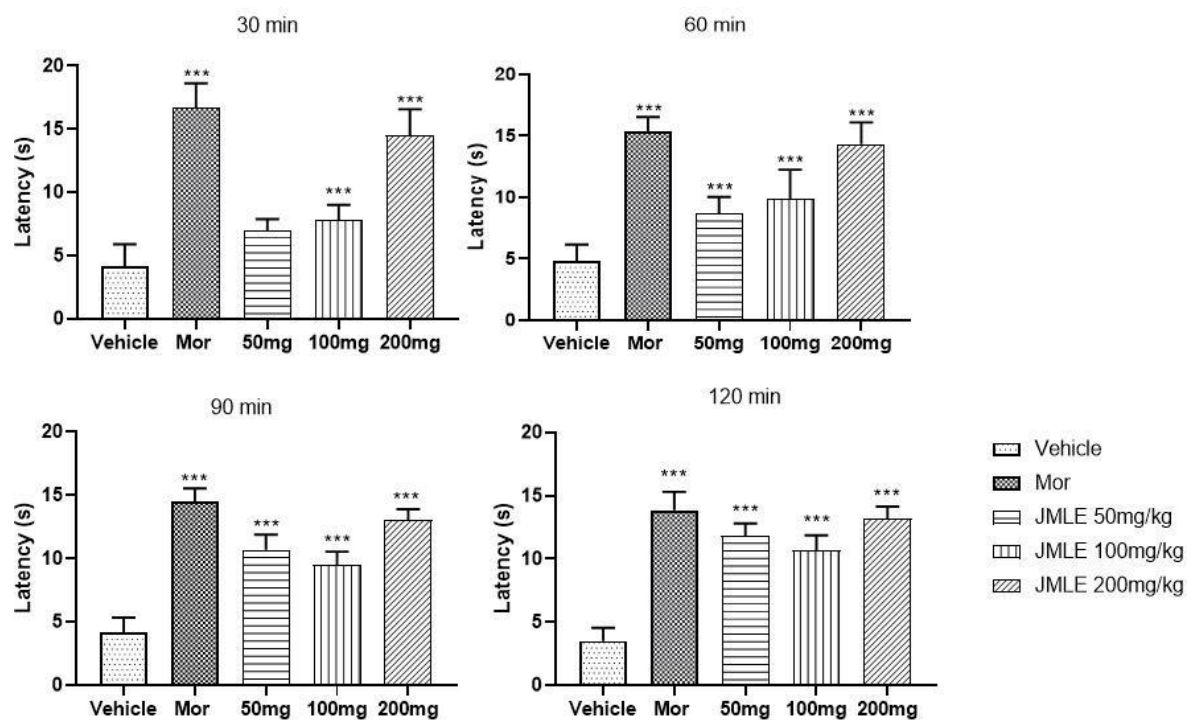




Fonte: Autora (2023).

To confirm the possibility of central action of JMLE, the tail immersion test was performed, which allows the evaluation of spinal and bulbospinal pathways (Santenna et al., 2019) through spinal reflexes mediated by  $\mu_2$ ,  $\kappa_1$  and  $\delta_2$  opioid receptors (Hosseinzadeh et al., 2002). In our results, the oral administration of JMLE increased the latency time at all evaluated moments. The JMLE dose of 200 mg/kg showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) in comparison to morphine at all analyzed times (Figure 7).

Figure 7 - Antinociceptive effect of *Jatropha mollissima* leaf hydroethanolic extract (JMLE) in the tail-immersion assay. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by the Bonferroni test. The asterisk (\*\*\*) indicates  $p < 0.001$  when compared to vehicle-treated mice.



Fonte: Autora (2023).

Flavonoid compounds, which are powerful inhibitors of the enzyme nitric oxide synthase type 2, responsible for the creation of nitric oxide (NO), and therefore indirectly block the cyclooxygenase and/or lipoxygenase and protein pathways, have been related to plant extracts' antinociceptive properties (Chandel et al., 2019; Ciumărnean et al., 2020; Tenuta et al., 2020). L-arginine/NO and kinase C these pathways have been linked to antinociceptive activity via a sequence of molecular processes where flavonoids may be useful (Arraki et al., 2020).

## Conclusion

JMLE, which is safe to mice at a acute oral dose of 2000 mg/kg, showed analgesic effects in models of pain induced by chemical and thermal stimuli, and possibly acts on the opioidergic pathway. Phytochemical screening by CCD revealed the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, saponins, reducing sugars, phenolic compounds and terpenes.

## Acknowledgements

The authors thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants (407192/2018-2) and fellowships (LAL, PMGP and THN), and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Finance Code 001) and *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for financial support (APQ-0108-2.08/14, APQ-0661-2.08/15, BFP-0122-4.03/19).

## References

- Aati, H. Y., El-Gamal, A. A., Kayser, O., & Ahmed, A. F. (2018). The phytochemical and biological investigation of *Jatropha pelargonifolia* root native to the Kingdom of Saudi Arabia. *Molecules*, 23(8), 1892.
- Abreu, M., 2000. Triagem fitoquímica de plantas por cromatografia em camada delgada (CCD). Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto
- Albuquerque, U. P., De Medeiros, P. M., De Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Neto, E. M. D. F. L., de Melo, J. G., & Dos Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of ethnopharmacology*, 114(3), 325-354.
- Araújo, J. R. S., da Silva Costa, M. W., Oliveira, W. B., Cavalcante, R. R., Almeida, P. M., & Martins, F. A. (2018). Larvicidal, cytotoxic and genotoxic effects of aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 40, e34501-e34501.
- Arraki, K., Totson, P., Attia, R., Zedet, A., Pudlo, M., Messaoud, C., ... & Girard, C. (2020). Arginase inhibitory properties of flavonoid compounds from the leaves of Mulberry (*Morus alba*, Moraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(9), 1269-1277.
- Bastos-Cavalcante, N., dos Santos-Barbosa, C. R., Silva-Pereira, R. L., Feitosa-Muniz, D., de Melo-Coutinho, H. D., Araújo-Rolim, L., & da Silva-Almeida, J. R. G. (2020, June).



Phytochemical analysis, antibacterial activity and antibiotic modifying action of *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill.(Euphorbiaceae). In *Anales de Biología* (No. 42, pp. 85-94).

- Boas, G. R. V., Dos Santos, A. C., Souza, R. I. C., de Araújo, F. H. S., Traesel, G. K., Marcelino, J. M., ... & Oesterreich, S. A. (2018). Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 1-12.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Braquehais, I. D., Vasconcelos, F. R., Ribeiro, A. R. C., Da Silva, A. R. A., Franca, M. G. A., De Lima, D. R., ... & Magalhães, F. E. A. (2016). Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18, 582-587.  
Kanj LF, Wilking SV, Phillips TJ. Pressure ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 1998;38(4):517-36.
- Chandel, P., Rawal, R. K., & Kaur, R. (2018). Natural products and their derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 10(20), 2471-2492.
- Ciumărnean, L., Milaciu, M. V., Runcan, O., Vesa, Ș. C., Răchișan, A. L., Negrean, V., ... & Dogaru, G. (2020). The effects of flavonoids in cardiovascular diseases. *Molecules*, 25(18), 4320.
- Costa, W. K., de Oliveira, J. R. S., de Oliveira, A. M., da Silva Santos, I. B., da Cunha, R. X., de Freitas, A. F. S., ... & da Silva, M. V. (2020). Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products*, 144, 112059.
- Costa, W. K., do Nascimento, M. F., dos Santos, C. R. B. et al. Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice. *Inflammopharmacol* 30, 599–607 (2022).
- Chung KC, Glori AK. Systematic review of skin graft donor-site dressings. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(1):307-8.
- Fröhlich, J. K., Stein, T., da Silva, L. A., Biavatti, M. W., Tonussi, C. R., & Lemos-Senna, E. (2017). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the *Jatropha isabellei* dichloromethane fraction and isolation and quantitative determination of jatrophone by UFLC-DAD. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1215-1222.
- Gomes, J. A. D. S., Félix-Silva, J., Morais Fernandes, J., Geraldo Amaral, J., Lopes, N. P., Tabosa do Egito, E. S., ... & Fernandes-Pedrosa, M. D. F. (2016). Aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) bail decreases local effects induced by Bothropic venom. *BioMed Research International*, 2016.

- Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Fadishei, M., & Mahmoudi, M. (2002). Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. *Phytomedicine*, 9(2), 135-141.
- Iqbal, M. O., Yahya, E. B., Andleeb, S., Ahmed, M. M., Javaid, M. U., Shakeel, W., & Iqbal, I. (2021). In vivo assessment of reversing Cisplatin-Induced nephrotoxicity using *Jatropha mollissima* crude extract and its potential cytotoxicity. *Saudi journal of biological sciences*, 28(12), 7373-7378.
- Markhan, K.R., 1982. *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic Press, London
- Melo, J. G., de Sousa Araújo, T. A., e Castro, T. N. D. A., Lyra de Vasconcelos Cabral, D., Do Desterro Rodrigues, M., Carneiro do Nascimento, S., ... & De Albuquerque, U. P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, 15(12), 8534-8542.
- Nascimento Magalhães, K., Guarniz, W. A. S., Sá, K. M., Freire, A. B., Monteiro, M. P., Nojosa, R. T., ... & Bandeira, M. A. M. (2019). Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. *Journal of ethnopharmacology*, 237, 314-353.
- OECD. 485: Genetic toxicology, Mouse Heritable Translocation Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, 4. 1986.
- Pinheiro, A.L.B. Advances and perspectives on tissue repair and healing. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.27, n.6, p.833-836, 2009.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Ramaiah, L., Hinrichs, M. J., Skuba, E. V., Iverson, W. O., & Ennulat, D. (2017). Interpreting and Integrating Clinical and Anatomic Pathology Results: Pulling It All Together. *Toxicologic Pathology*, 45(1), 223-237.
- Re, R., Pellegrini, N., Protegente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rocha, F. A. G., & Dantas, L. Í. S. (2009). Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) E pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. *Holos*, 4, 3-11.
- Sá- Filho, G. F. de, Silva, A. I. B. da ., Costa, E. M. da ., Nunes, L. E., Ribeiro, L. H. de F. ., Cavalcanti, J. R. L. de P., Guzen, F. P., Oliveira, L. C. de ., & Cavalcante, J. de S. (2021). Medicinal plants used in the Brazilian caatinga and the therapeutic potential of secondary metabolites: a review. *Research, Society and Development*, 10(13), e140101321096.
- Santenna, C., Kumar, S., Balakrishnan, S., Jhaj, R., & Ahmed, S. N. (2019). A comparative experimental study of analgesic activity of a novel non-steroidal anti-inflammatory

moleculas-zaltoprofen, and a standard drug-piroxicam, using murine models. *Journal of Experimental Pharmacology*, 11, 85.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Tenuta, M. C., Deguin, B., Loizzo, M. R., Dugay, A., Acquaviva, R., Malfa, G. A., ... & Tundis, R. (2020). Contribution of flavonoids and iridoids to the hypoglycaemic, antioxidant, and nitric oxide (NO) inhibitory activities of *Arbutus unedo* L. *Antioxidants*, 9(2), 184.

Vilar, J. C., Furtado, M. D. F. D., & de Carvalho, C. M. (2007). Effects of the aqueous extracts of plants of the genera *Apodanthera* (Cucurbitaceae) and *Jatropha* (Euphorbiaceae) on the lethality of the venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae).

Wagner, H., Bladt, S., 2001. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, second ed. Springer, New York.

Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.

## 4.2 ARTIGO 2 - HEALING EFFECT OF A HYDROETHANOLIC EXTRACT FROM *JATROPHA MOLLISSIMA* LEAVES IN *MUS MUSCULUS*

### **Healing effect of a hydroethanolic extract from *Jatropha mollissima* leaves in *Mus musculus***

Geane Rodrigues Chaves<sup>1</sup>, Wêndeo Kennedy Costa<sup>1</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>1</sup>, Alisson Macário de Oliveira<sup>1</sup>, Ivone Antônia de Souza<sup>3-2</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brasil.*

### **Introduction**

Wounds are damages to the skin or mucous membranes caused by physical, chemical, or biological trauma. The healing is a natural reaction of the body to tissue injury, comprising three interactive and overlapping phases: inflammatory phase, proliferation or granulation phase and remodeling or maturation phase (SAPORITO et al., 2018; SALAS-OROPEZA et al.,

2020; ANDJIĆ et al., 2022). During the treatment of wounds, one of the biggest problems is the emergence of infections, as they delay the process, resulting in systemic damage to the patient. Furthermore, it is worth mentioning that the proliferation of the microbial load overloads the immune system response and can lead to critical colonization and even sepsis (WANG et al., 2021; ALANAZI et al., 2022).

Annually, the medical expenses for the treatment of wounds increase, representing a considerable financial pressure on the global health system, and thus, increasing the interest in the search for drugs capable accelerating the healing process (ANDJIĆ et al., 2022). Studies have been carried out with medicinal plants with the purpose of bringing new therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous wounds (FARAHPOUR et al., 2020; ANDJIĆ et al., 2022).

*Jatropha mollissima* (Pohl) Bail (Euphorbiaceae) is an endemic medicinal plant found at Caatinga and it is popularly known as “pinhão-bravo”. It is known for antibacterial (ROCHA; DANTAS, 2009; BRAQUEHAIS et al., 2016; QUEIROZ-NETO et al., 2019; BASTOS-CAVALCANTE et al., 2020), antiophidic (VILAR et al., 2007; GOMES et al., 2016), antioxidant (Melo et al., 2010; IQBAL et al., 2021) antihelminthic (Ribeiro et al., 2014), hemostatic (DANTAS et al., 2021), and nephrotoxicity-reversing (IQBAL et al., 2021) activities. Furthermore, the milky-looking sap (latex), which is produced during the stem injury of *J. mollissima*, has been used by the ancients for wound healing and for controlling hemorrhages, infections, and inflammations (QUEIROZ NETO et al., 2019).

In a previous study, a hydroethanolic extract from *J. mollissima* leaves (JMLE) showed to be safe to mice when administered orally (2000 mg/kg) and displayed antinociceptive activity. In the present work, based on the reports of popular uses of *J. mollissima* against wounds and infections, we evaluated the healing effect of a gel containing JMLE in (*Mus musculus*) mice.

## **Materials and methods**

### ***Plant material***

Plant material was collected in July 2020 in Caruaru, city of Pernambuco, Brazil, with access registered (A648A31) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). A voucher copy (number 82,721) was deposited at the Geraldo Mariz herbarium of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE).

To prepare the extract, the leaves were washed and dried at 37 °C for five days. The powder was added to a solution of ethanol: water (1:1 v/v) in the proportion of 10% (w/v). Then, the mixture was processed in a turboextractor in four cycles of 30 s at intervals of four minutes and cotton filtered. The extract obtained (JMLE) was concentrated in a rotary evaporator (50 °C) and then lyophilized. For gel formulation, 47.75 g of gel were used of hydroxyethylcellulose (Natrosol) [containing methylparaben, propylparaben, EDTA and glycerin] and 2.25 g of ethanolic extract, to obtain a final concentration of 50 mg/g.

### ***Animals***

For the tests, male Swiss mice were used, weighing between 30 and 35g and aged between 8 and 10 weeks. Animals were housed in temperature-controlled rooms (22–25 °C) under a 12/12 h light/dark cycle and received water and food ad libitum. All procedures were in accordance with Brazilian legislation for animal experimentation and the study has a favorable opinion by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Pernambuco (n° 0014/2020).

### ***Wound Model***

At day 0, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (5 mg/kg) and then, the back was shaved and cleaned with 70% ethyl alcohol and size 1 open excision wounds × 1 cm and 2 mm deep with the aid of a punch. After wound induction, the mice were housed in individually separate cages (Boudjelal et al., 2020).

### ***Experimental Design***

After wound induction, mice were randomly divided into three groups (n=8 per group). Twenty-four hours after wound induction, the following treatments were performed: group I, negative control where the wounds were not treated; group II, positive control where the animals were treated with FitoScar<sup>®</sup> ointment; and group III, treated with the JMLE gel (50 mg/g). All treatments were topically applied once a day for 14 days, using a sterile *swab*, in the amount of 50 mg. On the 15th day after starting treatment, the animals were anesthetized by

intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Blood samples were collected for further analysis.

### ***Wound Contraction***

The wound of each mouse was photographed immediately after formation and on the 7th and 15th day after injury induction. The wound area was measured using Image J software. The percentage of wound contraction was calculated following the model described by Boudjelal et al. (2020) for each animal using the following formula: % Wound Contraction = [(Initial Wound Area – Day Specific Wound Area)/Initial Wound Area] × 100.

### ***Measurement of serum cytokine levels***

Serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were measured by ELISA kits according to the instructions provided by the manufacturer. Results are expressed as pg/mL.

### ***Statistical analyzes***

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software version 8.0. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used when analyzing data for an independent variable. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM, and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

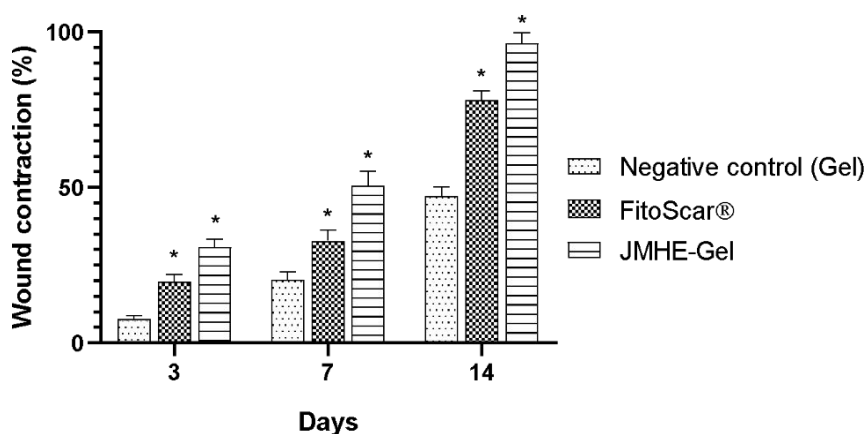
### ***Results and Discussion***

Experimental treatment with Fitoscar and JMHE-gel accelerated the healing process of skin wounds in mice, when compared to the control treated with gel alone (Figure 1). The percentage reduction of wound area in the control group ranged from 7.65 to 47.12% from the seventh to the 14th day. Treatment with the standard drug, FitoScar®, achieved a reduction of up to 78% on the last day of treatment. The JMHE-gel formulation caused a wound reduction of 30.75, 50.5 and 96.25% on the 3rd, 7th and 15th day of treatment, respectively. These data show the healing action of JMHE-gel, even with more promising results than the standard drug.

To evaluate the participation of inflammatory factors in the wound healing process, the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) were quantified in the blood of

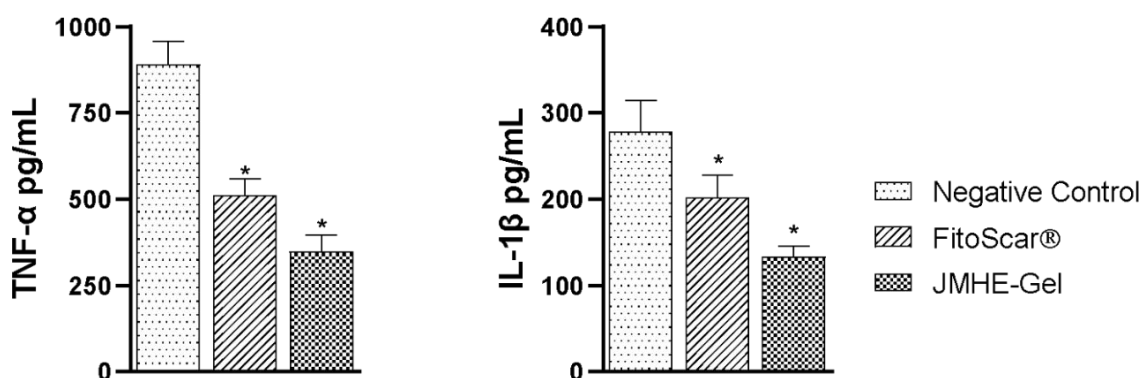
animals from all groups in the healing test and the results are expressed in the Figure 2. Animals treated with JMHE gel showed 60.94% and 51.97% reduction in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels, respectively, in comparison with control, evidencing the reduction of systemic inflammation. The standard drug, on the other hand, promoted a reduction of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by 42.51% and 21.31%, respectively.

Figure 1 - Effect of FitoScar, JMHE-gel (50 mg/g) and negative control (gel) (mg/g)? treatment on skin wound contraction in mice. Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8/group). (\*) indicates significant difference (p < 0.05) compared to the negative control by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test.



Fonte: Autora (2023).

Figure 2 - Effect of FitoScar, JMHE-gel (50 mg/g) and negative control (gel) (mg/g)? treatment on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8/group). (\*) indicates significant difference (p < 0.05) compared to the negative control by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test.



Fonte: Autora (2023).

SACHDEVA et al. (2011) developed an ointment containing organic extract (methanol: acetone: water) from the stem bark of *Jatropha curcas* L for application in skin wounds in healthy rats which specie Swiss mice. The authors concluded that the ointment stimulated wound concentration and increased the tensile strength of the incision. *Jatropha neopauciflora* latex promotes wound healing, probably by preventing infections by microorganisms, inhibiting inflammation, and acting as an antioxidant (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2017). The high content of phenolics and flavonoids in JMLE may be accounting fot its heating properties due to the antioxidant activity of these compounds. BEKTAS et al. (2020) reported that a chitosan-based gel formulation containing vitexin significantly accelerated wound healing both *in vivo* and *in vitro*. Thus, the presence of vitexin in JMLE may also explain the potente healing effect.

## Conclusion

JMLE showed to be a healing-accelerating agent when incorporated into a gel formulation, reducing the inflammation due to the tissue injury. At the same time, it reduces serum cytokine levels.

## References

- ABDEL-SALAM, B. K. A. H. Modulatory Effect of Whey Proteins in Some Cytokines Involved in Wound Healing in Male Diabetic Albino Rats. **Inflammation**. v. 37, n. 5, p. 1616-1622, 2014.
- ALANAZ, I A. K.; ALQASMI, M. H.; ALROUJI, M.; KURIR, F A.; ALMUHANNA, Y.; JOSEPH, B.; ASAD, M. Antibacterial Activity of *Syzygium aromaticum* (Clove) Bud Oil and Its Interaction with Imipenem in Controlling Wound Infections in Rats Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 5, p. 8551, 2022.
- ANDJIĆ, M.; DRAGINIĆ, N.; KOČOVIĆ, A.; JEREMIĆ, J.; VUČIĆEVIĆ, K.; JEREMIĆ, N.; KRSTONOŠIĆ, V.; BOŽIN, B.; KLADAR, N.; ČAPO, I.; ANDRIJEVIĆ, L.; PECARSKI, D.; BOLEVICH, S.; JAKOVLJEVIĆ, V.; BRADIĆ, J. Immortelle essential oil-based ointment improves wound healing in a diabetic rat model. **Biomed Pharmacother**, v. 150, p. 112941, 2022.
- ARANTES, P. B., et al. Utilização da microcorrentes no processo de cicatrização. **Diálogos Interdisciplinares**, v. 7, n. 3, p. 215-222. 2018.
- BERNARDO, A. F. C., et al. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em Foco**. n. 11. 2019.



BOUDJELAL, A.; SMERIGLIO, A.; GINESTRA, G.; DENARO, M.; TROMBETTA, D. Phytochemical Profile, Safety Assessment and Wound Healing Activity of *Artemisia absinthium* L. **Plants (Basel)**, v. 12, p. 1744, 2020.

CARVALHO, L., et al. Muscle hypertrophy and strength gains after resistance training with different volume-matched loads: a systematic review and meta-analysis. **Appl Physiol Nutr Metab.** v. 47, n. 4, p. 357-368. 2022.

DABIRI, G., et al. Choosing a wound dressing based on common wound characteristics. **Adv Wound Care.** v. 5, n. 1, p. 32-41. 2016.

DANTAS, M. V. O.; NOGUEIRA, P. L.; LIMA, F. O.; OLIVEIRA, D. C. P.; GOMES, E. N. S.; RODRIGUES, J. F. B.; AMOAH, S. K. S.; ROSENDO, R. A.; DA PENHA, E. S.; 2021.

DANTAS, A. F. M.; FOOK, M. V. L.; LACERDA-SANTOS R.; MELQUIADES DE MEDEIROS, L. A. D. In vivo Hemostatic Activity of *Jatropha mollissima*: A Triple-Blinded, Randomized, Controlled Trial in an Animal Model. **Eur J Dent**, v. 15, p. 741-745, 2021.

DIPERSIO, C.M., et al. Integrin-mediated regulation of epidermal wound functions. **Department Cell Tissue Res.** v. 365, n. 3, p. 467-482. 2016.

FARAHPOUR, M. R.; PIRKHEZR, E.; ASHRAFIAN, A.; SONBOLI, A. Accelerated healing by topical administration of *Salvia officinalis* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infected wound model. **Biomed Pharmacother**, v. 128, p. 110120, 2020.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; MENEZES, Y. A.; CABRAL, B.; CÂMARA, R. B.; SILVA-JUNIOR, A. A.; ROCHA, H. A.; REBECCHI, I. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. **PLoS One.** v. 8, p. 104952, 2014.

GONÇALVES, R.Q. Prevalência de feridas em pacientes atendidos em uma rede primária de saúde. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

GOMES, J. A.; FÉLIX-SILVA, J.; MORAIS FERNANDES, J.; GERALDO AMARAL, J.; LOPES, N. P.; TABOSA DO EGITO, E. S.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A.; MARIA ZUCOLOTTI, S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Aqueous Leaf Extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail Decreases Local Effects Induced by *Bothropic* Venom. **Biomed Res Int**, v.2016, p. 6101742, 2016.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, A. B.; ALARCON-AGUILAR, F. J.; ALMANZA-PEREZ, J. C.; NIETO-YAÑEZ, O.; OLIVARES-SANCHEZ, J. M.; DURAN-DIAZ, A. & CANALES-MARTINEZ, M. M. Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax. **Journal of ethnopharmacology**, v. 204, p. 1-7, 2017.

- IQBAL, M. O.; YAHYA, E. B. In vivo assessment of reversing aminoglycoside antibiotics nephrotoxicity using *Jatropha mollissima* crude extract. **Tissue Cell**, v. 71, p. 101525, 2021.
- KOIVISTO, L., et al. Integrins in Wound Healing. **Adv. Wound Care**. v. 3, p. 762–783. 2014.
- KONDO, T. e ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**. v. 203, n. 1, p. 93-98, 2010.
- MALAQUIAS, T. Tratamentos não convencionais para feridas: revisão integrativa da literatura. **Revista Contexto Saúde**. v. 15, n. 29, p. 22-29, 2015.
- MELO, E. A.; ANDRADE, R. A. M. S. COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DO UMBUZEIRO. **Alim. Nutr.**, n. 3, p. 453-457, 2010.
- OLIVEIRA, A. C., et al . Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta paul**. v. 32, n. 2, p. 194-201. 2019.
- OLIVEIRA, I.V.P.M. E DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinária Brasília**. v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.
- PITZ, H. S., et al. In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, p. 1–6. 2016.
- QIANG, L., et al. Epidermal SIRT1 regulates inflammation, cell migration, and wound healing. **Scientific Reports**. v. 7, p. 14110. 2017.
- RIBEIRO, A. R.; ANDRADE, F. D.; MEDEIROS, M. D.; CAMBOIM, A. D.; JUNIOR, F. P.; ATHAYDE, A. C.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 1051-1055, 2014.
- RODRIGUES, M., et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev**. v. 99, n. 1, p. 665-706. 2019.
- ROCHA, F. A. G.; DANTAS, L. I. S. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DO LÁTEX DO AVELOZ (*Euphorbia tirucalli* L.), PINHÃO BRAVO (*Jatropha mollissima* L.) E PINHÃO ROXO (*Jatropha gossypifolia* L.) SOBRE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS. **Sistema de Información Científica Redalyc**, v. 4, p. 1, 2009.
- SABINO, F., et al. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. **Metalloproteinases in Medicine**. v. 2, p. 1-8, 2015.

SACHDEVA, K.; GARG, P.; SINGHAL, M.; SRIVASTAVA, B. Wound healing potential of extract of *Jatropha curcas* L. (stem bark) in rats. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 67-72, 2011.

SALAS-OROPEZA, J.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; PEREZ-TORRES, A.; CASTELL-RODRIGUEZ, A. E.; BECERRIL-MILLAN, R.; RODRIGUEZ-MONROY, M. A.; CANALES-MARTINEZ, M. M. Wound Healing Activity of the Essential Oil of *Bursera morelensis*, in Mice. **Molecules**, v. 25, p. 1795, 2020.

SAPORITO, R. C.; LOPEZ PINEIRO, M. A.; MIGDEN, M. R.; SILAPUNT, S. Recognizing Skin Popping Scars: A Complication of Illicit Drug Use. **Cureus**. v. 6, p. 2726, 2018.

SINGH, M. R., et al. Innovative approaches in wound healing: Trajectory and advances. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**. v. 41, n. 3, p. 202–212, 2013.

SZWED, D. N., e SANTOS, V. L. P. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.1, n.15, p. 7-17. 2015.

UDHAYAKUMAR, S., et al. Novel fibrous collagen-based cream accelerates fibroblast growth for wound healing applications: in vitro and in vivo evaluation. **Biomaterials Science**. v.5, n.9, p.1868-1883, 2017.

WANG, H.; XU, Z.; ZHAO, M.; LIU, G.; WU, J. Advances of hydrogel dressings in diabetic wounds. **Biomater Sci**. v. 5, p. 1530-1546, 2021.

## 5 CONCLUSÕES

Nos últimos anos as investigações desenvolvidas com plantas medicinais têm trazido benefícios terapêuticos de vários vegetais com potencialidade farmacológica tanto em patologias graves como nos processos regenerativos cicatriciais, o que representa uma estratégia relevante na busca de novos fármacos. Na pesquisa realizada experimentalmente, os resultados apontaram que, o JMLE, é seguro para camundongos na dose oral de 2.000 mg/kg, e apresentou efeitos analgésicos em modelos de dor induzida por estímulos químicos e térmicos, possivelmente atua na via opiodérgica. A triagem fitoquímica por CCD revelou a presença de flavonóides, derivados cinâmicos, saponinas, açúcares redutores, compostos fenólicos e terpenos. Bem como, o JMLE mostrou-se um agente acelerador da cicatrização quando incorporado à formulação de gel, reduzindo a inflamação decorrente da lesão tecidual. Ao mesmo tempo, reduz os níveis séricos de citocinas.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. P. et al. Antifungal activity of the essential oils of *Plectranthus neochilus* (Lamiaceae) and *Tagetes erecta* (Asteraceae) cultivated in Brazil. **Int J Complement Alt Med**, v. 11, n. 1, p. 00343, 2018.
- ALBUQUERQUE, B. R. et al. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.
- ALELIGN, T. et al. Evaluation of acute and sub-acute toxicity of selected traditional antiurolithiatic medicinal plant extracts in Wistar albino rats. **Toxicology Reports**, v. 7, n. 1, p. 1356-1365, 2020.
- ATEBA, S. B.; NJAMEN, D.; KRENN, L. The genus *Eriosema* (Fabaceae): From the ethnopharmacology to an evidence-based Phyto therapeutic perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 1, 2021.
- BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Effect of salinity stress on growth and physiology of medicinal plants. In: *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. **Springer**, v. 1, p. 177-188, 2017.
- BIANCHI, Marco E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.
- BIGIO, N. C.; SECCO, R. S.; MOREIRA, A. S. 2020. *Jatropha* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17580>>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 114147, 2020.
- BJARNASON, I. et al. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500-514, 2018.
- BORGES, C. V. et al. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In: *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. Springer, Cham, v. 1, p. 1, p. 259-277, 2017.
- BUBALO, M. C. et al. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, n. 1, p. 52-73, 2018.
- CARVALHO JÚNIOR, A. R. et al. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 784, 2018.

- CASTANHEIRA, F. V. S; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.
- CASTILHO, P. F. et al. General and genetic toxicology studies of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. seeds *in vitro* and *in vivo* assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 280, n. 2, p. 114478, 2021.
- CAVALCANTE, N. B.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, A. D.; DA SILVA ALMEIDA, J. R. G. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-biological interactions**, v. 318, n. 3, p. 108976, 2020.
- CAVALCANTI, D. F. G.; DA SILVEIRA, D. M.; DA SILVA, G. C. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 45931-45946, 2020.
- CERAVOLO, I. P. et al. *Aspidosperma pyrifolium*, a medicinal plant from the Brazilian caatinga, displays a high antiplasmodial activity and low cytotoxicity. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p.1- 26, 2018.
- CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204, 2018.
- CHRISTENSEN, C. S. L; SEAL, C. E.; RICO-ARCE, L. Threatened status of neglected and underutilized *Jatropha* (Euphorbiaceae) species endemic to Mexico. **Revista mexicana de biodiversidad**, v. 90, n. 1, p. 1, 2019.
- COOKE, J. P. Inflammation and its role in regeneration and repair: A caution for novel anti-inflammatory therapies. **Circulation research**, v. 124, n. 8, p. 1166-1168, 2019.
- CORDEIRO, I., SECCO, R. 2015. *Jatropha* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB36115>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)
- COSTA, G. et al. Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. **Curr. Med. Chem.**, v.19, n. 1, p. 2876-2900. 2012.
- COSTA, W. K. et al. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 144, n. 1, p. 112059, 2020.
- DAVID, B. A.; KUBES, P. Exploring the complex role of chemokines and chemoattractants in vivo on leukocyte dynamics. **Immunological reviews**, v. 289, n. 1, p. 9-30, 2019.
- DEYNO, S. et al. Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2020.

FAROOQ, U. et al. Sedative and antinociceptive activities of two new sesquiterpenes isolated from *Ricinus communis*. **Chinese journal of natural medicines**, v. 16, n. 3, p. 225-230, 2018.

FÉLIX-SILVA, Juliana et al. Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213, n. 1, p. 12-20, 2018.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. especial, 2011.

FREITAS, A. F. S. et al. Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. *South African Journal of Botany*, v. 133, n. 1, p. 30-39, 2020.

FREZZA, C. et al. Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae. In: *Studies in natural products chemistry*. **Elsevier**, v. 1, n. 1, p. 125-178, 2019.

GOMES DE MELO, J. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

GOVAERTS, R. et al. World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae) **The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew**, v. 1, n. 4, p. 1-1622, 2000.

HAMIDZADEH, K. et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. **Annual review of physiology**, v. 79, n. 1, p. 567-592, 2017.

HARTUNG, T. Evolution of toxicological science: the need for change. **International Journal of Risk Assessment and Management**, v. 20, n. 1-3, p. 21-45, 2017.

HE, Q. et al. Genus *Sapium* (Euphorbiaceae): A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 277, n. 1, p. 114206, 2021.

HELFAND W. H.; COWEN D. L. **Pharmacy – an illustrated history**, Harry N. Abrams, New York, 1990.

HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. **Herbal medicine**, v. 1, n. 1, p. 13, 2019.

IQBAL, M. O.; YAHYA, E. B. *In vivo* assessment of reversing aminoglycoside antibiotics nephrotoxicity using *Jatropha mollissima* crude extract. **Tissue and Cell**, v. 72, n. 1, p. 101525, 2021.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2018.

JOHNSON III, Bobby L. et al. Neutrophil derived microparticles increase mortality and the counter-inflammatory response in a murine model of sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 10, p. 2554-2563, 2017.

- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins basic pathology e-book. **Elsevier Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1, 2017.
- LEAL, C. K. A.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de. *Jatropha molissima*. **Acta Farm.**, v. 24, n. 1, p. 5-13, 2005.
- LENY, L.; GINTING, E. E.; HAFIZ, I. Formulation and evaluation of candlenut (*Aleurites moluccana* L.) oil in gel preparation. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 5, p. 41-43, 2020.
- LESSA, T. et al. Known unknowns: Filling the gaps in scientific knowledge production in the Caatinga. **Plos one**, v. 14, n. 7, p. 0219359, 2019.
- MARINHO, A. C. et al. Karyotype and genome size comparative analyses among six species of the oilseed-bearing genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 442-449, 2018.
- MARTÍNEZ, C. A.; MOSQUERA, O. M.; NIÑO, J. Medicinal plants from the genus Alchornea (Euphorbiaceae): A review of their ethnopharmacology uses and phytochemistry. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 16, n. 3, p. 162-205, 2017.
- MOURA, L. F. W. G. et al. Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidocolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, n. 1, p. 1670-1679, 2019.
- MOURA, N. et al. Ensaios toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes in vivo e in vitro. **Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1, 2012.
- MUIRURI, S. K. et al. Mechanisms and approaches towards enhanced drought tolerance in cassava (*Manihot esculenta*). **Current Plant Biology**, v. 28, n. 1, p. 100227, 2021.
- NAIR, K. P. Rubber (*Hevea brasiliensis*). In: **Tree Crops**. Springer, Cham, 2021. p. 287-332.
- NDHLALA, Ashwell R. et al. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. **Food and chemical toxicology**, v. 62, n. 1, p. 609-621, 2013.
- NISHIOKA, S. A.; ESCALANTE, R. D. Poisoning by the ingestion of seeds of the fruit of the "cotieira" (*Joannesia princeps*). **Sao Paulo Medical Journal**, v. 115, n. 1, p. 1366-1367, 1997.
- NICHOLAS, M. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 28-37, 2019.
- NUVOLONI, F. M.; MONDIN, A. De S.; FERES, Reinaldo JF. Review of Lorryia Oudemans, 1925 (Acari: Tydeidae: Tydeinae) associated with *Hevea* spp. in Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 46, n. 4, p. 235-240, 2020.
- ORELLANA-CUÉLLAR, L. R. et al. Toxicidad aguda de *Aleurites moluccana* por via oral en ratas Sprague-Dawley. **Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana**, v. 19, n. 1, p. 1, 2014.



OLIVEIRA, A. M. et al. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 234, n. 1, p. 96-105, 2019.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. OECD. Guideline 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. 2008.

PAHWA, R. et al. Chronic inflammation. **Medicinal Library of Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1, 2023.

PARKER, G. A. Cells of the Immune System. In: Immunopathology in Toxicology and Drug Development. **Humana Press Cham**, v. 1, n. 1, p. 95-201, 2017.

RAJA, S. N. et al. The revised IASP definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976, 2020.

RANA, S. M. M. et al. Susceptibility of microorganism to selected medicinal plants in Bangladesh. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 11, p. 911-917, 2014.

RANG, et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8º edição. Elsevier Brasil, 2016.

ROCHA, F. A. G.; DANTAS, L. Í. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e Pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2009.

SALEHI, B. et al. Cucurbits plants: A key emphasis to its pharmacological potential. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1854, 2019.

SAMA, H. et al. Antifungal potential and fatty acid profile of two *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) oils. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 6, n. 1, p. 100244, 2021.

SANTANA, J. A.; SOUTO, J. S. Diversidade e Estrutura Fitossociológica da Caatinga na Estação Ecológica do Seridó-RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 232-242, 2006.

SANTOS, M. O. et al. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the Caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 1, n. 1, p.2766-2779, 2018.

SANTOS, I. B. S. et al. Antioxidant Action and In Vivo Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Myrciaria floribunda* Fruit Peels: Possible Involvement of Opioidergic System. **Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences**, v.1, n. 1, p. 1, 2020.

SECCO, R. S. et al. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae sl in Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 227-242, 2012.

- SHAH, F. A. et al. Karrikin improves osmotic and salt stress tolerance via the regulation of the redox homeostasis in the oil plant *Sapium sebiferum*. **Frontiers in plant science**, v. 11, n. 1, p. 216, 2020.
- SHIH, M.; MORGAN, J. A. Metabolic flux analysis of secondary metabolism in plants. **Metabolic engineering communications**, v. 10, n. 1, p. 00123, 2020.
- SILVA, N. C. S. et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **Únicas cadernos acadêmicos**, v. 3, n. 1, p. 10, 2017.
- SILVA, J. M. C.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. **Springer**, v. 1, n. 1, p. 1, 2018.
- SILVA, A. J. A. POTENCIALIDADES MEDICINAIS DE *Jatropha gossypifolia* E *Cnidocolus phyllacanthus*. **Cadernos Macambira**, v. 5, n. 1, p. 17-18, 2020.
- SILVA PEREIRA, M. G.; COELHO-FERREIRA, M. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental, Abaetetuba, Pará. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 57-68, 2017.
- SOEHNLEIN, O. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 248-261, 2017.
- SOLIMAN, N. et al. Systematic review and meta-analysis of cannabinoids, cannabis-based medicines, and endocannabinoid system modulators tested for antinociceptive effects in animal models of injury-related or pathological persistent pain. **Pain**, v. 162, n. 1, p. S26, 2021.
- SOUZA, M. M. et al. Phytochemical Analysis and Antinociceptive Properties of Hydroalcoholic Extracts of *Aleurites moluccanus* Bark. **Planta Medica**, v. 87, n. 10/11, p. 896-906, 2021.
- SOUZA, M. C. et al. Topical and systemic use of *Joannesia princeps* vell. LC seed oil in acute pain and inflammation induced by different agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n. 1, p. 113554, 2021.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 4ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 768, 2019.
- SSEGAWA, P.; NKUUTU, D. N. Diversity of vascular plants on Ssesse islands in Lake Victoria, central Uganda. **African Journal of Ecology**, v. 44, n. 1, p. 22-29, 2006.
- STOCKINGS, E. et al. Cannabis and cannabinoids for the treatment of people with chronic noncancer pain conditions: a systematic review and meta-analysis of controlled and observational studies. **Pain**, v. 159, n. 10, p. 1932-1954, 2018.
- SUGIMOTO, M. A. et al. Mediators of the resolution of the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212-227, 2019.

- SUSILOWATI, A. et al. Morphology and germination of the candlenut seed (*Aleurites moluccana*) from Samosir Island-North Sumatra. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **IOP Publishing**, v. 1, n. 1, p. 012156, 2020.
- TARIQ, A. et al. Ethnopharmacology and toxicology of Pakistani medicinal plants used to treat gynecological complaints and sexually transmitted infections. **South African Journal of Botany**, v. 114, n. 1, p. 132-149, 2018.
- TONKENS, R. An overview of the drug development process. **Physician executive**, v. 31, n. 3, p. 48, 2005.
- TREEDE, R. et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, n. 1, p. 19-27, 2019.
- TRIPATHI, S. et al. Distillery wastewater detoxification and management through phytoremediation employing *Ricinus communis* L. **Bioresource Technology**, v. 333, n. 1, p. 125192, 2021.
- TUNGMUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.
- UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J. et al. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* NE Brown in mice and rats. **Heliyon**, v. 5, n. 1, p. 01179, 2019.
- VAN DE DONK, T. et al. An experimental randomized study on the analgesic effects of pharmaceutical-grade cannabis in chronic pain patients with fibromyalgia. **Pain**, v. 160, n. 4, p. 860, 2019.
- WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 10, p. 2112-2118, 2003.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization, Geneva, 1998.
- XU, J. et al. Acute and subacute toxicity study of 1, 8-cineole in mice. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 4, p. 1495, 2014.
- YATOO, M. et al. Anti-inflammatory drugs and herbs with special emphasis on herbal medicines for countering inflammatory diseases and disorders-a review. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 12, n. 1, p. 39-58, 2018.
- YEBOAH, A. et al. Castor oil (*Ricinus communis*): a review on the chemical composition and physicochemical properties. **Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 1, 2020.
- YUAN, H. et al. Lathyrane diterpenoids from *Jatropha podagrica* and their antitumor activities in human osteosarcoma cells. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5089-5095, 2021.
- ZHOU, X. et al. Nano-formulations for transdermal drug delivery: a review. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, n. 12, p. 1713-1724, 2018.