

***In vitro* antioxidant capacity and *in vivo* hepatoprotective effect of *Allophylus edulis* leaf extract**

Capacidade antioxidante in vitro e efeito hepatoprotetor in vivo do extrato de folhas de Allophylus edulis

Antonia K. Galeano¹, Juan R. Centurión¹, María S. Soverina¹, Laura G. Mereles², Miguel A. Campuzano-Bublitz¹, María L. Kennedy^{1*}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169, San Lorenzo, Paraguay; ²Departamento de Bioquímica de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169, San Lorenzo, Paraguay

* corresponding author / autora para correspondência: lukenrol@qui.una.py

Abstract

Allophylus edulis is used in folk medicine primarily for liver conditions such as hepatitis, liver cancer and liver cirrhosis. *In vitro* hepatoprotective activity was previously demonstrated. The aim of this work was to evaluate the antioxidant capacity and hepatoprotective effect of the ethanolic extract of *A. edulis* in mice. This was done by first determining the acute toxicity of the extract, evaluating the general behavior, and subsequently verifying the effect on paracetamol-induced toxic hepatitis in male mice. Additionally, the phytochemical profile was performed, and the content of total phenols and its total antioxidant capacity were quantified through the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulfonic acid radical cation (ABTS) method. The extract of *A. edulis* leaves did not demonstrate adverse effects up to 2000 mg/kg, p.o. Anthraquinones, flavonoids, triterpenoids, and tannins were detected. A high content of total phenolic compounds (TPC) was related to a high antioxidant capacity. Regarding the results of the biological tests, *A. edulis* did not affect the general behavior of the mice, and all doses tested decreased glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity, the main liver enzyme markers of hepatocellular damage. It is concluded that *A. edulis* has hepatoprotective activity, which could be related to its antioxidant activity.

Keywords: *Allophylus edulis*; hepatoprotective; acetaminophen; liver enzymes markers; antioxidant capacity

Resumo

Allophylus edulis é usado na medicina tradicional, principalmente em doenças do fígado, como hepatite, cancro e cirrose hepática. A atividade hepatoprotetora *in vitro* foi previamente demonstrada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante e o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico de *A. edulis* em murganhos. Para tal, foi determinada a toxicidade aguda do extrato, avaliando o comportamento geral e, posteriormente, verificando o efeito sobre a hepatite tóxica induzida por paracetamol em murganhos macho. O perfil fitoquímico foi definido, e quantificado o teor de fenóis totais e a sua capacidade antioxidante total através do método do catião radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS). O extrato de folhas de *A. edulis* não demonstrou efeitos adversos até 2000 mg/kg, p.o. Foram detetados antraquinonas, flavonoides, triterpenoides e taninos. Um elevado teor de compostos fenólicos totais (TPC) foi relacionado com uma elevada capacidade antioxidante. Relativamente, aos resultados dos testes biológicos, *A. edulis* não afetou o comportamento geral em murganhos, e todas as doses testadas diminuíram a atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), os principais marcadores das enzimas hepáticas de dano hepatocelular. Conclui-se que *A. edulis* possui atividade hepatoprotetora, o que pode estar relacionado com a sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Allophylus edulis*; hepatoprotetor; paracetamol; marcadores de enzimas hepáticas; capacidade antioxidante

Introduction

The liver is essential for the metabolism of virtually all foreign substances (1). In addition, it synthesizes plasma proteins, fatty acids and is responsible for the metabolism of carbohydrates. It also stores fat-soluble vitamins, metals, such as iron and copper. This organ detoxifies drugs and other types of chemical products that are not water-soluble by means of liver enzymes that are responsible for oxidization, reduction, hydrolysis, or demethylation. Finally, Kupffer cells are responsible for the immune functions of the liver (2).

Hepatitis is an inflammation of the liver caused by a variety of infectious viruses and noninfectious agents, leading to a range of health problems, some of which can be fatal. Viral hepatitis is the most common cause of liver cirrhosis, liver cancer, and viral hepatitis-related deaths (3). The appearance of a pathological process such as hepatitis results in a public health problem, as it is generally asymptomatic, with symptoms only appearing in an advanced stage of the disease. According to a WHO report, a large percentage of affected persons do not have sufficient resources to pay for the costs of diagnosis and treatment, favoring the advance of this silent disease, which explains its high morbidity and mortality rate in those affected (4).

The infusion of the leaves of *Allophylus edulis* is popularly used in Paraguay to treat liver conditions (hepatitis, liver cancer, and cirrhosis), as a stimulant of the bile ducts, against inflammation of the throat, for intestinal problems, as an anti-diabetic, and as a cholagogue. The boiled leaves are used to wash wounds and as a treatment against high blood pressure (5,6). Regarding the biological activities, the *in vitro* hepatoprotective activity of the leaves of *A. edulis* var *gracilis* tested in primary culture of hepatocytes with damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and galactosamine has been reported, and it was confirmed that the C-glycosyl flavones present in the leaves have an important role in the hepatoprotective activity of the plant (7). In addition, the inhibitory capacity of the angiotensin-converting enzyme (8), antiulcerogenic activity (9), genotoxic activity (10), antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, and insect repellency (11,12) were reported.

This work evaluates the hepatoprotective activity of *Allophylus edulis* in mice and the antioxidant activity of the extract, in addition to the identification of the main secondary metabolites.

Introdução

O fígado é essencial para o metabolismo de praticamente todas as substâncias que nos são estranhas (1). Além disso, sintetiza proteínas plasmáticas, ácidos gordos e é responsável pelo metabolismo dos hidratos de carbono. Também armazena vitaminas lipossolúveis, metais, como ferro e cobre. Este é o órgão que nos desintoxica de fármacos e outros tipos de produtos químicos não hidrossolúveis, por meio de enzimas hepáticas que são responsáveis pela sua oxidação, redução, hidrolisação ou desmetilação. Finalmente, as células de Kupffer são responsáveis pela capacidade imunológica do fígado (2).

A hepatite é uma inflamação do fígado causada por uma variedade de vírus infecciosos e agentes não infecciosos que levam a vários problemas de saúde, alguns dos quais podem ser fatais. A hepatite viral é a causa mais comum de cirrose hepática, cancro de fígado e mortes relacionadas à hepatite viral (3). O aparecimento dum processo patológico como a hepatite resulta num problema de saúde pública, pois geralmente é assintomático, ou seja, os sintomas aparecem num estágio avançado da doença. Segundo a OMS (organização mundial de saúde), grande parte dos afetados não possui recursos suficientes para suportar os custos de diagnóstico e tratamento, favorecendo o avanço dessa doença silenciosa, o que explica sua alta taxa de morbimortalidade nos mesmos (4).

A infusão das folhas de *Allophylus edulis* é utilizada popularmente no Paraguai para tratar doenças do fígado (hepatite, cancro de fígado, cirrose), como estimulante das vias biliares, na inflamação da garganta, em problemas intestinais, como antidiabéticos e como colagogo. As folhas cozidas são usadas para lavar feridas e tratar a hipertensão arterial (5,6). Em relação às atividades biológicas, foi relatada a atividade hepatoprotetora *in vitro* das folhas de *A. edulis* var *gracilis* testadas em cultivo primário de hepatócitos danificados pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) e galactosamina, e foi confirmado que as C-glicosil flavonas presentes nas folhas têm um papel importante na atividade hepatoprotetora da planta (7). Além disso, foram relatadas capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (8), atividade antiulcerogénica (9), atividade genotóxica (10), atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e repelente de insetos (11,12).

O presente trabalho centra-se na avaliação da atividade hepatoprotetora de *Allophylus edulis* em murganhos e da atividade antioxidante do extrato, identificando os principais metabólitos secundários.

Materials and Methods

Plant material and extraction

Leaves of *Allophylus edulis* Radlk. (St Hil. Jusset Camb.) syn. *Allophylus guaraniticus* (StHil.Juss et Camb.) known as kokū (Sapindaceae) were collected from J.A. Saldívar, Central, Paraguay (25°26'50,4"S y 57° 27'07,1W). The material was identified by researchers from the Botany Department, and a voucher sample was filed in FCQ Herbarium (G Delmás 284). 200 grams of dried and powdered leaves were extracted with ethanol (1:5), first by ultrasonication (3X/day, 15 minutes each, 3 days, 30°C). The extracted material was separated, and the residual material was again extracted with ethanol by reflux (15 minutes, 3X, 1L each). The resulting extract (34%) was kept in a desiccator after solvent evaporation. On the day of each experiment, the extract was dissolved in ethanol/propylene glycol/distilled water (0.5:4:5.5) before oral administration in mice.

Reagents and equipment

Absolute ethyl alcohol 99,5% was purchased from CICARELLI Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina). TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), gallic acid monohydrate, acetaminophen, and silymarin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The 2,2, azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulfonic acid radical cation (ABTS) was purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany), gentamicin from LASCA (San Lorenzo, Paraguay), and sodium pentobarbital (Nembutal) from Abbott (Toyko, Japan). Ammonium persulfate, propylene glycol and ethanol were purchased locally. Kits for the estimation of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST or GOT), alanine aminotransferase (ALT or GPT) were purchased from HUMAN Diagnostics Worldwide (Wiesbaden, Germany). Measurements were made in a Biosystem BTS 350 semi-automatic analyzer UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Preliminary phytochemical analysis

Phytochemical analysis of ethanol extract of *A. edulis* was performed according to the methodology described (13), based on the color typically developed by major chemical groups. Briefly, anthraquinones were detected with ammonia solution after extraction with an organic solvent. The appearance of a yellow color when the sample was dissolved in a NaOH solution was evidence

Materiais e Métodos

Material vegetal e extração

Folhas de *Allophylus edulis* Radlk. (St Hil. Jusset Camb.) syn. *Allophylus guaraniticus* (StHil.Juss et Camb.) conhecido como Cocú (Sapindaceae) foram coletadas de J.A. Saldívar, Central, Paraguai (25°26'50,4"S e 57° 27'07,1W). O material foi identificado por investigadores do Departamento de Botânica, sendo arquivada uma amostra da espécie botânica no Herbário FCQ (G Delmás 284). Duzentos grammas de folhas secas e em pó foram extraídas com etanol (1:5), primeiro por ultrassom (3X/dia, 15 minutos cada, 3 dias, 30 °C). O material extraído foi separado e o material residual foi novamente extraído com etanol por refluxo (15 minutos, 3X, 1 L cada). O extrato resultante (34 %) foi mantido no exsiccador após a evaporação do solvente, e no dia de cada análise experimental foi dissolvido em etanol/propilenoglicol/água destilada (0,5:4:5,5) antes da administração oral em murganhos.

Reagentes e equipamentos

O álcool etílico absoluto 99,5% foi comprado à CICARELLI Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fé, Argentina). TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ácido gálico mono-hidratado, acetaminofeno e silimarina foram comprados à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O 2,2, azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6 catião ácido sulfônico radical (ABTS) foi comprado à AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemanha), gentamicina à LASCA (San Lorenzo, Paraguay), e pentobarbital de sódio (Nembutal) à Abbott (Tóquio, Japão). Persulfato de amônio, propilenglicol e etanol foram adquiridos localmente. Os kits para a estimativa de fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST o GOT), alanina aminotransferase (ALT o GPT) foram adquiridos à HUMAN Diagnostics Worldwide (Wiesbaden, Alemanha). As medições foram feitas num analisador semi-automático Biosystem BTS 350 UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Análise fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica do extrato etanólico de *A. edulis* foi realizada de acordo com a metodologia descrita (13), baseada na cor tipicamente desenvolvida pelos principais grupos químicos. Resumidamente, as antraquinonas foram detetadas com solução de amônia após extração com solvente orgânico. O flavonoide foi analisado quando uma cor amarela apareceu, aquando

of flavonoids. The Liebermann-Burchard reaction was performed to identify triterpenoids. The presence of tannin was noted following reaction with ferric chloride.

Total phenol content and ABTS radical inhibition test

Determination of total phenol content in the extract was preceded by ultrasound-assisted extraction of phenols with methanol:water (60:40) and subsequently acetone:water (70:30), following reported methodology (14). Total phenolic compounds (TPC) were measured spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu method (16). The blue-colored complex was quantified at 765 nm. A gallic acid calibration curve was used (5-150 µg/mL), and distilled water was used as the control. The analysis was performed in triplicate and total phenol content was expressed in mg of gallic acid equivalents per 100 g of sample.

Determination of the antioxidant activity of *A. edulis* extract was carried out according to the methodology described by Re *et al* 1999 (16). This is based on the discoloration of ABTS•+ cationic radical obtained after the reaction of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate, incubated 20 hours at room temperature in the dark. On the day of measurement, the solution was diluted with absolute ethanol to reach an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 730 nm. The TAC (total antioxidant activity) quantification was performed as described previously using the linear regression method. TROLOX solutions (0-320 µM) were used as standards. The results were expressed as µM Trolox equivalents (TEAC) /g sample, and the antioxidant capacity was expressed in µMTEAC/g *per gram* of extract (17). In addition, the effective inhibitory concentration (IC50) was determined and subsequently expressed as % inhibition (%I) of sample, which was calculated according to the following: $\%I = (\text{Abs control} - \text{Abs sample} / \text{Abs control}) \times 100$ (Abs control: solvent absorbance; Abs sample extract solution absorbance). Measurements were made in triplicate.

Animal experiments

Swiss albino male and female mice, weighing 25-35 g, were used. The animals were housed in plastic cages at a constant room temperature (23-25°C), with a 12:12 h light-dark cycle, in a humidity-controlled environment (50-60%). They were fed daily with standard animal pellets (7 g/day each) and water *ad libitum*. All assays were conducted in accordance with international standards of animal welfare, and the research protocol was approved by the Bioethical Committee of the Facultad de Ciencias Químicas (CEI

da dissolução da amostra numa solução de NaOH. A reação de Liebermann-Burchard foi feita para identificar triterpenoides. A presença de tanino foi observada após a reação com cloreto férrico.

Teor de fenólicos totais e teste de inibição do radical ABTS

A determinação do teor de fenólicos totais no extrato foi precedida por uma extração assistida por ultrassom de fenóis com metanol:água (60:40) e, posteriormente, acetona:água (70:30) seguindo a metodologia descrita (14). Os compostos fenólicos totais (TPC) foram medidos espectrofotometricamente com o método de Folin-Ciocalteu (16). O complexo de cor azul foi quantificado a 765 nm. Uma curva de calibração de ácido gálico foi usada (5-150 µg/mL) e a água destilada foi usada como controlo. A análise foi realizada em triplicado e o teor de fenólicos totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra.

A determinação da atividade antioxidante do extrato de *A. edulis* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re. *et al* 1999 (16). Isto é, foi medida baseada na descoloração do radical catiónico ABTS•+ obtido após a reação de 7 mM ABTS com 2,45 mM persulfato de potássio, incubado 20 horas à temperatura ambiente no escuro. No dia da medição, foi diluído com etanol absoluto para atingir absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 730 nm. A quantificação de CAT (atividade antioxidante total) foi realizada conforme descrito anteriormente pelo método de regressão linear. As soluções TROLOX (0-320 µM) foram usadas como padrão. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox µM (TEAC)/g amostra e a capacidade antioxidante foi expressa em µM de TEAC/g por grama de extrato (17). Além disso, a concentração inibitória efetiva (IC50) foi determinada e subsequentemente expressa como % de inibição (%I) da amostra, que foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\%I = (\text{controlo de abs-amostra} - \text{abs-amostra} / \text{controlo de abs}) \times 100$ (abs controlo: absorvância do solvente; amostra de abs: absorvância da solução do extrato). As medições foram feitas em triplicado.

Experimentação animal

Foram utilizados murganhos albinos suíços, machos e fêmeas, pesando 25-35 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas em temperatura ambiente constante (23-25 °C), com ciclo luz-escuro de 12:12 h, em ambiente com humidade controlada (50-60 %). Foram alimentados diariamente com ração animal padrão (7 g/dia cada) e água *ad libitum*. Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com as normas internacionais

469/19). The minimum number of animals and duration of observation required to obtain consistent data were used, and each animal was used once (18).

Acute oral toxicity test and evaluation of general behavior (Irwin test)

The acute toxicity test was conducted following the guidelines of Test No. 420 of the Organization for Economic Cooperation and Development (19). It was conducted in female mice, with oral administration of *A. edulis* ethanolic extract in fixed doses of 5, 50, 300 and 2000 mg/kg. Male mice were used for the behavioral test (Irwin test), consisting of an observational procedure to evaluate the primary effects of a drug or drug candidate on the behavior and physiological functions of the central nervous system (20, 21). The different groups received the ethanolic extract of *A. edulis* orally in doses of 50, 100, 200, and 400 mg/kg.

Acetaminophen induced hepatotoxicity and treatments

Six hours fasted Swiss albino male mice were randomly divided into seven groups (n=8). They were treated for 4 days as detailed: Vehicle group (V; 2.5% ethanol: 40% propylene glycol: 57.5% water, p.o.); Acetaminophen group (APAP; water); Silymarin group (SM; 150 mg/kg of silymarin, p.o.); groups Ae50, Ae100, Ae200, Ae 400 (treated with 50; 100, 200 and 400 mg/kg of *A. edulis* extract, respectively, p.o.). Acute hepatotoxicity was induced on the fourth day using acetaminophen (APAP, 300 mg/kg, i.p.). Two hours after the oral treatment, all animals, except those in the vehicle group, were induced (22). Three hours after APAP administration, a blood sample was collected by cardiac puncture following anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). Serum GOT, GPT and ALP were determined.

Biochemical parameters

Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and alkaline phosphatase (ALP) were measured from the blood serum. To obtain the blood serum, the fresh blood samples were incubated in a water bath at 37°C for 20 min and then subjected to centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm. The samples were processed immediately after preparation. Control serum (normal and pathological Humatrol) was processed before each measurement as an internal quality control, and the values obtained for the different biochemical parameters were consistently within the expected ranges. The activities of GPT, GOT and ALP were determined through the optimized UV

de bem-estar animal e o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Ciências Químicas (CEI 469/19). Cada animal foi usado uma vez. O número de animais utilizado e a duração da observação foram os mínimos necessários para obter dados consistentes (18).

Teste de toxicidade oral aguda e avaliação do comportamento geral (teste de Irwin)

O teste de toxicidade aguda foi realizado, de acordo com as diretrizes do Teste nº 420 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico (19). Foi realizado em murganhos fêmeas, com doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, por via oral. Foi utilizado o teste comportamental (teste de Irwin) que consiste num procedimento observacional para avaliar os efeitos primários de um fármaco ou candidato a fármaco sobre o comportamento e funções fisiológicas do Sistema Nervoso Central, de murganhos machos (20, 21). Os diferentes grupos receberam o extrato etanólico de *A. edulis* nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, por via oral.

Hepatotoxicidade induzida por paracetamol e tratamento

Murganhos machos albinos suíços em jejum de seis horas foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n=8) e tratados por 4 dias conforme segue: grupo veículo (V; 2,5% etanol: 40% propilenoglicol: 57,5% água, p.o.); grupo paracetamol (APAP; água); grupo silimarina (SM; 150 mg/kg de silimarina, p.o.); grupos Ae50, Ae100, Ae200, Ae 400 (tratados com 50; 100, 200 e 400 mg/Kg de extrato de *A. edulis*, respectivamente, p.o.). A hepatotoxicidade aguda foi induzida no quarto dia usando paracetamol (APAP, 300 mg/kg, i.p.). Duas horas após o tratamento oral, todos os animais, exceto os do grupo veículo, foram induzidos (22). Três horas após a administração de APAP, a amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Foram determinados TGO, TGP e ALP séricos.

Parâmetros bioquímicos

As transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina (ALP) foram determinadas a partir do soro. Para obtenção do soro sanguíneo, as amostras de sangue fresco foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 20 minutos e depois submetidas à centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm. As amostras foram processadas

Table 1 - Total phenol content and antioxidant capacity of *A. edulis* ethanol extract.**Tabela 1** - Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante do extrato etanólico de *A. edulis*.

Parameter / Parâmetro	Mean \pm SD / Média \pm DP
Total phenols compounds (mg GAE/100 g extract) / Compostos fenólicos totais (mg GAE / 100 g extrato)	36.95 \pm 0.38
Total antioxidant capacity ABTS (μ M TEAC/g) / Capacidade antioxidante total ABTS (μ M TEAC / g)	50.21 \pm 0.90
IC50 _{Extract} / IC50 _{Extrato}	17.25 \pm 0.35
IC50 _{TROLOX} / IC50 _{TROLOX}	33.72

GAE: gallic acid equivalent / GAE: equivalente de ácido gálico

method (IFCC). The absorbance was measured at 340 nm in a spectrophotometer, and the results expressed in U/L (23, 24).

Statistical analysis

The data were processed using the GraphPad Prism 7.0. (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The analysis of variance (ANOVA) of one factor followed by Dunnett or the Tukey test was used for comparative analysis. Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and a p-value <0.05 considered statistically significant.

Results

Preliminary Phytochemical Analysis and Total Antioxidant Capacity of A. edulis extract

The TPC content, TAC, and phytochemicals on *A. edulis* ethanolic extract are presented in Table 1. The IC50 of the extract was observed to be lower than the IC50 of the control, suggesting a high antioxidant capacity of the extract. Preliminary phytochemical analysis of *A. edulis* extract indicated the presence of tannins, anthraquinones, anthraquinones glycosides, flavonoids, and triterpenoids (Table 2).

imediatamente após serem obtidas. O soro controle (Humatrol normal e patológico) foi processado antes de cada determinação, como controle de qualidade interno, e os valores obtidos para os diferentes parâmetros bioquímicos estiveram sempre dentro das faixas esperadas. As atividades de TGP, TGO e ALP foram determinadas pelo método UV otimizado (IFCC). A absorvância foi medida a 340 nm no espectrofotômetro, e os resultados expressos em U/L (23, 24).

Análise estatística

Os dados foram processados no GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). A análise de variância (ANOVA) de um fator seguida do teste de Dunnett ou do teste de Tukey foi utilizada para a análise comparativa. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Resultados

Análise Fitoquímica Preliminar e Capacidade Antioxidante Total do Extrato de A. edulis

O teor de TPC, TAC e fitoquímicos do extrato etanólico de *A. edulis* são apresentados na Tabela 1. Observou-se que a IC50 do extrato foi menor que a IC50 do controle, sugerindo uma alta capacidade antioxidante do extrato utilizado. A presença de taninos, antraquinonas, glicosídeos de antraquinonas, flavonoides e triterpenoides foi evidenciada após análise fitoquímica preliminar do extrato de *A. edulis* (Tabela 2).

Table 2 - Metabolites identified in *A. edulis* ethanol extract

Tabela 2 - Metabolitos identificados no extrato de *A. edulis*.

Metabolite / Metabolito	Result / Resultado
Tannin / Tanino	Positive / Positivo
Reduced sugar / Açúcar reduzido	Negative / Negativo
Non-reduced sugar / Açúcar não reduzido	Negative / Negativo
Gum / Goma	Negative / Negativo
Saponin / Saponina	Negative / Negativo
Anthraquinone / Antraquinona	Positive / Positivo
Anthraquinone glycosides/ Glicosídeos de antraquinona	Positive / Positivo
Flavonoid / Flavonoide	Positive / Positivo
Carotenoid / Carotenoide	Negative / Negativo
Triterpenoid / Triterpenoide	Positive / Positivo
Alkaloid / Alcalóide	Negative / Negativo

Acute toxicity and behavioral effect

The acute toxicity assay conducted following Test No. 420 of the Organization for Economic Cooperation and Development determined that the extract does not show acute lethal toxicity, as no mortality was observed. No difference in body weights or evidence of liver, lung, pancreas, heart, or kidney damage was detected after 14 days (19). Water and food consumption were similar to the control group during the observation period. Responses to nociceptive stimuli, behavior, grooming, and postural reflex remained normal and control-like following treatment.

*Determination of the hepatoprotective effect of *A. edulis* against acetaminophen-induced damage*

In the hepatotoxicity model used, acute liver damage was induced in the animals on the fourth day of treatment, except for the animals in the control group that were treated with the extract solvent. Measurements were made on the serum of the animals obtained at the end of the experiment (after anesthesia), and the serum activity of GPT (U/L) was verified. When comparing the values obtained in the control and pathological groups (APAP), a statistically significant difference ($p < 0.0001$) between was verified, which indicated that the dose of acetaminophen used effectively induces liver damage in these experimental animals, considering the elevation of this parameter in APAP group. In addition, a statistically significant difference was also verified between the APAP group, and the SM group treated with silymarin, the reference for hepatoprotection effect, and between the APAP group and the Ae50, Ae100, Ae 200

Toxicidade aguda e efeito comportamental

O ensaio de toxicidade aguda realizado seguindo o Teste nº 420 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico determinou que o extrato não apresenta toxicidade aguda letal, não foi evidenciada mortalidade. Nenhuma diferença no peso corporal ou evidência de danos no fígado, pulmão, pâncreas, coração ou rim após 14 dias foi detetada (19). O consumo de água e ração comparado ao grupo controle foi semelhante durante o período de observação. As respostas aos estímulos nociceptivos, comportamento, higiene e reflexo postural mantiveram-se normais e controladas após o tratamento.

*Determinação do efeito hepatoprotetor de *A. edulis* contra os danos induzidos pelo paracetamol*

No modelo de hepatotoxicidade utilizado, a lesão hepática aguda foi induzida nos animais ao quarto dia de tratamento, exceto nos animais do grupo controle que foram tratados com o solvente do extrato.

As medições foram feitas no soro dos animais obtidos no final da experimentação após a anestesia verificando a atividade sérica da TGP (U/L). Ao comparar os valores obtidos nos grupos controle e patológico (APAP), verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) o que indicou que a dose de paracetamol utilizada efetivamente induz lesão hepática nestes animais experimentais, considerando a elevação deste parâmetro no grupo APAP. Além disso, também foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o grupo APAP e o grupo SM tratado com silimarina,

and Ae400 groups, which were treated with different doses of the ethanolic extract of *A. edulis* (50, 100, 200 and 400 mg/kg, respectively). Serum level of GPT was lower in all extract-treated groups as well as in the SM group. Finally, no statistical difference was observed between the groups treated with the extract or with silymarin and the control group (Figure 1).

The serum GOT activity (U/L) of the different groups was also measured (Figure 2). The results showed that when comparing the values obtained in the control group and the pathological group (APAP), a statistically significant difference was evident ($p < 0.0001$), with activity highly elevated in the APAP group. This again indicated the validity of the method used to evaluate the hepatoprotective activity of the extract. Additionally, when comparing the data of serum levels of GOT of the animals of the APAP group with the data of the groups SM (treated with silymarin, $p < 0.01$), Ae50, Ae100, Ae200 and Ae400 (50, 100, 200 and 400 mg/kg of *A. edulis*, respectively, $p < 0.0001$), a statistically significant difference was found between them, silymarin reduced

referência para efeito hepatoprotetor, e entre o grupo APAP e os grupos Ae50, Ae100, Ae200 e Ae400, que foram tratados com diferentes doses do extrato etanólico de *A. edulis* (50, 100, 200 e 400 mg/kg respectivamente). O nível sérico de TGP foi menor em todos os grupos tratados com o extrato, bem como no grupo SM. Por fim, não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados com extrato ou com silimarina e o grupo controle (Figura 1).

A atividade TGO sérica (U/L) dos diferentes grupos também foi medida (Figura 2). Os resultados mostraram que ao comparar os valores obtidos no grupo controle e no grupo patológico (APAP), uma diferença estatisticamente significativa foi evidenciada ($p < 0,0001$) com destaque para o APAP. Isso indicou, novamente, a validade do método usado para avaliar a atividade hepatoprotetora do extrato. Adicionalmente, ao comparar os dados dos níveis séricos de TGO dos animais do grupo APAP com os dados dos grupos SM (tratados com silimarina, $p < 0,01$), Ae50, Ae100, Ae200 e Ae400 (50, 100, 200 e 400 mg/kg de *A. edulis*, respectivamente, $p < 0,0001$), foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre eles, com a

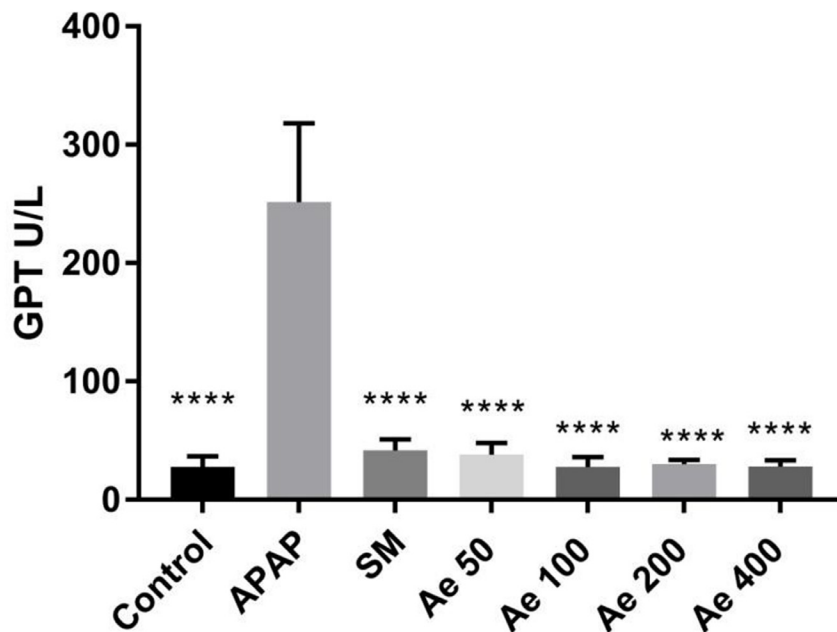


Figure 1 - Effect of oral administration of *A. edulis* ethanol extract on serum GPT (alanine aminotransferase or glutamic-pyruvic transaminase) concentration, in mice with liver damage induced by acetaminophen. Each bar represents mean values \pm SD, n=8. ANOVA followed by Tukey test. **** $p < 0,0001$, compared APAP group.

Figura 1 - Efeito da administração oral de extrato etanólico de *A. edulis* na concentração sérica de TGP (alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico-pirúvica), em murganços com lesão hepática induzida por paracetamol. Cada barra representa valores médios \pm DP, n=8. ANOVA seguida de teste de Tukey. **** $p < 0,0001$, comparado com grupo APAP.

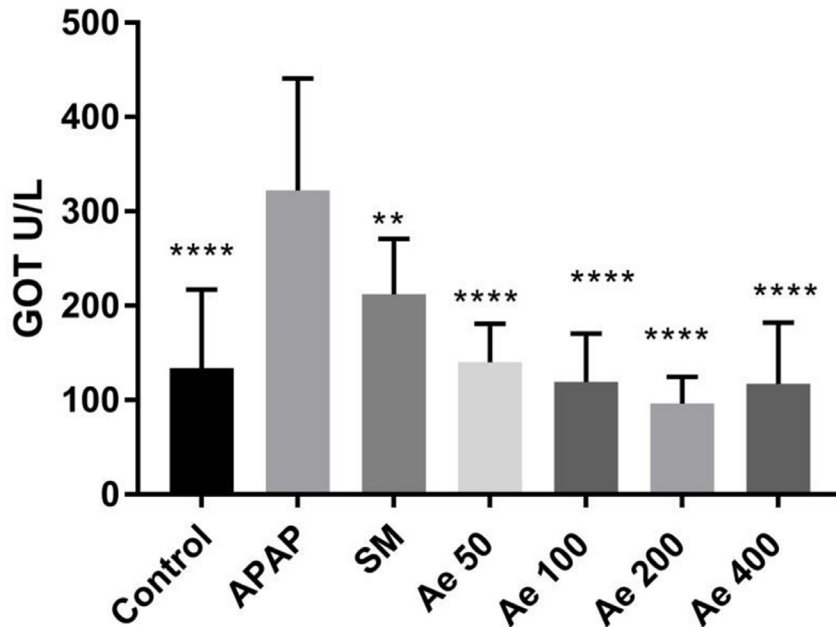


Figure 2 -Effect of oral administration of *A. edulis* ethanol extract on serum GOT (aspartate aminotransferase or glutamic-oxaloacetic transaminase) concentration, in mice with liver damage induced by acetaminophen. Each bar represents mean values \pm SD, n=8. ANOVA followed by Tukey test. ****p<0,0001, compared APAP group.

Figura 2 - Efeito da administração oral de extrato etanólico de *A. edulis* na concentração sérica de TGO (aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética), em murganhos com lesão hepática induzida por paracetamol. Cada barra representa valores médios \pm DP, n=8. ANOVA seguida de teste de Tukey. ****p<0,0001, comparado com grupo APAP.

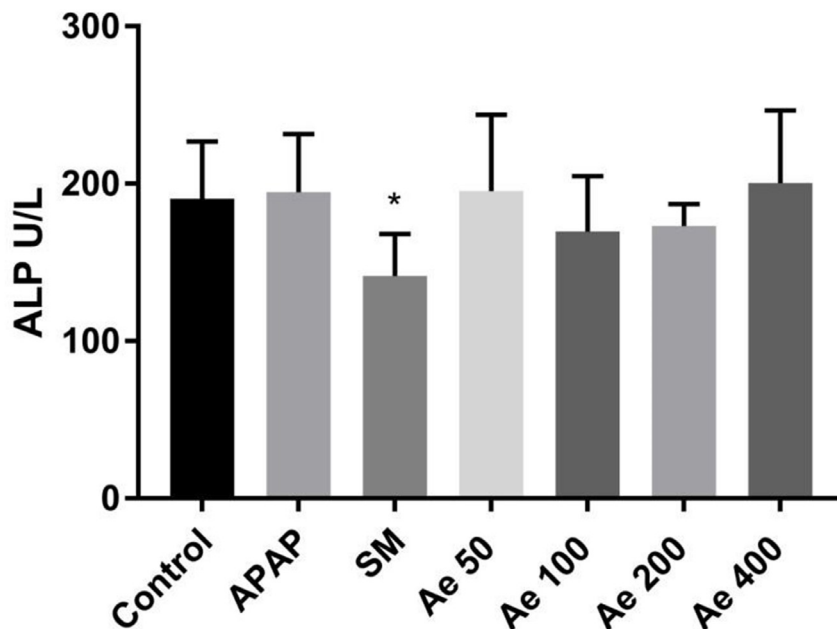


Figure 3 - Effect of oral administration of *A. edulis* ethanol extract on serum ALP (alkaline phosphatase) concentration, in mice with liver damage induced by acetaminophen. Each bar represents mean values \pm SD, n=8. ANOVA followed by Tukey test. *p< 0,05, compared APAP group.

Figura 3 - Efeito da administração oral de extrato etanólico de *A. edulis* na concentração sérica de ALP (fosfatase alcalina), em murganhos com lesão hepática induzida por paracetamol. Cada barra representa valores médios \pm DP, n=8. ANOVA seguida de teste de Tukey. *p<0,05, comparado com grupo APAP.

GOT values. Furthermore, no difference was observed between the groups that received the extract or silymarin, and the control group.

Serum alkaline phosphatase (ALP) activity in the group treated with silymarin (SM) showed a statistically significant reduction when compared to the group with toxic hepatitis induced by acetaminophen ($p < 0.05$) (Figure 3). The other treated groups did not present a significant difference with respect to the pathological group, presenting similar FA values.

Discussion

The toxicity test of the ethanolic extract of *A. edulis* in mice, up to a dose of 2000 mg/kg, showed that the extract did not cause morphoanatomical alterations in the main organs studied or the death of the animal. Therefore, according to the OECD, the extract is safe for oral use. This result is in line with a previous study using similar doses of an aqueous extract of *A. edulis* in Wistar rats, i.e., no evidence of toxicity was observed; however, an alteration in the weight of the liver was found with very high doses (5000 mg/kg), which suggests signs of toxicity in this organ (12). Following the guidelines of the OECD, doses of up to 2g/kg were used in this study (19). Likewise, the low toxicity of *A. edulis* has been reported in *in vitro* models with *Artemia salina* (25). The results obtained when evaluating the effect of the ethanolic extract of *A. edulis* on the general behavior of mice also showed the absence of general effects on autonomic or ethological parameters such as lethargy, dysuria, vomiting or regurgitation, diarrhea, spontaneous motility, defecation, piloerection, photophobia, and xerostomia.

It has been reported that *A. edulis* contains flavonoids, phenolic compounds, triterpenoids, anthraquinones, and that it does not contain saponins in aqueous and ethanolic extracts (10,25), which coincides with our results. Other authors reported the presence of alkaloids, which differs from our results (26)

The phenolic content in the extract was 36.954 ± 0.379 mg GAE/100g, while that reported in another study using *A. edulis* ethanolic extract was 17.6 ± 0.6 mg GAE/100g and for the aqueous extract was 9.0 ± 0.2 mg GAE/100g (12). This difference could be due to the dilution used by the authors (200 μ g/mL), or the time elapsed after the reaction until the absorbance measurement (2 hours), which differs slightly from the conditions used in our study.

silymarina a reduzir os valores de TGO. Além disso, não foi observada diferença entre os grupos que receberam o extrato ou a silymarina e o grupo controle.

A atividade da fosfatase alcalina sérica (ALP) no grupo tratado com silymarina (SM) apresentou decréscimo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo com hepatite tóxica induzida por paracetamol ($p < 0,05$) (Figura 3). Os demais grupos tratados não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo patológico, com valores de AF semelhantes entre todos.

Discussão

O teste de toxicidade do extrato etanólico de *A. edulis* em murgancho mostrou que até a dose de 2000 mg/kg não causou alterações morfoanatômicas nos principais órgãos estudados nem a morte do animal. Ou seja, de acordo com a OCDE, a sua aplicação oral é segura. Este resultado está relacionado com o que foi demonstrado utilizando doses semelhantes de extrato aquoso de *A. edulis* em ratos Wistar, ou seja, não foi observada evidência de toxicidade. Com doses muito altas (5000 mg/kg) foi encontrada uma alteração no peso do fígado, o que sugere sinais de toxicidade no órgão (12). Seguindo as diretrizes da OCDE, doses de até 2 g/kg foram utilizadas neste estudo (19). Da mesma forma, a baixa toxicidade de *A. edulis* foi relatada em modelos *in vitro* com *Artemia salina* (25). Os resultados obtidos ao avaliar o efeito do extrato etanólico de *A. edulis* sobre o comportamento geral de murganchos também mostraram a ausência de efeitos gerais sobre parâmetros autonômicos ou etológicos, como letargia, disúria, vômito ou regurgitação, diarréia, motilidade espontânea, defecação, piloereção, fotofobia e xerostomia.

Foi relatado que *A. edulis* contém flavonoides, compostos fenólicos, triterpenoides, antraquinonas, e que não contém saponinas em extratos aquosos e etanólicos (10,25), o que coincide com resultados obtidos neste estudo. Outros autores relataram a presença de alcalóides, o que difere de nossos resultados (26).

O conteúdo fenólico no extrato foi de $36,954 \pm 0,379$ mg GAE/100 g, enquanto o descrito noutro estudo utilizando extrato etanólico de *A. edulis* foi de $17,6 \pm 0,6$ mg GAE/100 g e para o extrato aquoso foi de $9,0 \pm 0,2$ mg GAE/100 g (12). Essa diferença pode ser devido à diluição utilizada pelos autores (200 μ g/mL), ou ao tempo decorrido após a reação até a medida da absorvância (2 horas), que difere ligeiramente do que é usado no nosso estudo.

The antioxidant activity expressed in IC₅₀ was higher (36.954 ± 0.379 mg GAE/100 g) than that reported in another study using *A. edulis* ethanolic extract (17.6 ± 0.6 mg GAE/100 g) and other aqueous extract (9.0 ± 0.2 mg GAE/100 g) previously reported (12), this difference could be due to the dilutions used and assay conditions. Our result is similar to data reported from experiments conducted using the ethyl acetate fraction (27). The *A. edulis* extract was higher antioxidant capacity (lower IC₅₀) than the reference substance TROLOX (Table 1). It has been reported that the antioxidant capacity of *A. edulis* is related to the extract TPC content (12). On the other hand, a moderate antioxidant activity of the essential oil of *A. edulis* and its main component viridiflorol has been reported (28). Moreover, aqueous extracts of another member of this genus, *A. rubifolius*, have exhibited a high antioxidant activity (IC₅₀ 7.1 ± 0.1 µg/mL) in the DDPH assay (29).

Regarding the study of the effect of the extract on the model of hepatotoxicity induced by APAP in mice, it was determined that the pathological group exhibited an increase in GPT and GOT activity compared to the control group (p < 0.0001) since the metabolism of APAP and hepatic necrosis are the main events during the first hours after the administration of APAP (22). A significant reduction (p < 0.0001) of liver enzymes GPT, GOT was also found in animals treated with all doses of *A. edulis* extract compared to the control group. This result is similar to that observed in the group treated with silymarin (GPT p < 0.0001 and GOT p < 0.01). In the case of silymarin, this result was what was expected, considering that it is the reference hepatic protective drug (30).

Regarding the activity of ALP, it was found that only the group treated with silymarin presented a statistically significant reduction with respect to the pathological group (p < 0.05), in the other groups no difference was observed with the APAP group. This could be because this enzyme is not a specific marker of the liver and therefore the presence of an alteration in the level of ALP is not always indicative of hepatocellular damage (31), but when there is hepatic obstruction of the bile flow, it can be elevated (32). In addition, the time elapsed for sample collection after APAP administration in the hepatotoxicity model used is not sufficient to cause damage at that level.

In general terms, similar values were observed in the GPT and GOT parameters in the animals treated with the different doses of *A. edulis* extract and those treated with silymarin. This could be due to the antioxidant property of *A. edulis* that is associated with the

A atividade antioxidante expressa em IC₅₀ foi maior (36,954 ± 0,379 mg GAE/100g) do que a descrita noutro estudo utilizando extrato etanólico de *A. edulis* (17,6 ± 0,6 mg GAE/100g) e outro extrato aquoso (9,0 ± 0,2 mg GAE/100g) relatados anteriormente (12), essa diferença pode ser devido às diluições utilizadas e às condições do ensaio. Os resultados deste estudo são semelhantes aos dados descritos para a fração de acetato de etilo (27). O extrato de *A. edulis* apresentou maior capacidade antioxidante (menor IC₅₀) do que a substância de referência TROLOX (Tabela 1). Tem sido relatado que a capacidade antioxidante de *A. edulis* está relacionada com o teor de TPC do extrato (12). Por outro lado foi relatada uma atividade antioxidante moderada do óleo essencial de *A. edulis* e do seu principal componente viridiflorol (28). Além disso, o extrato aquoso doutro membro deste género, *A. rubifolius*, exibiu uma alta atividade antioxidante (IC₅₀ 7,1 ± 0,1 µg/mL) no ensaio DDPH (29).

Relativamente ao estudo do efeito do extrato no modelo de hepatotoxicidade induzida por APAP em murganhos, foi determinado que o grupo patológico apresentou um aumento na atividade de TGP e TGO em relação ao grupo controlo (p < 0,0001), uma vez que o metabolismo do APAP e necrose hepática são os principais eventos durante as primeiras horas após a administração de APAP (22). Uma redução significativa (p < 0,0001) das enzimas hepáticas TGP e TGO, também, foi encontrada em animais tratados com todas as doses de extrato de *A. edulis* em relação ao grupo controlo. Esse resultado é semelhante ao observado no grupo tratado com silimarina (TGP p < 0,0001 e TGO p < 0,01). No caso da silimarina, esse resultado era espectável, considerando que é o fármaco hepatoprotetor de referência (30).

No que diz respeito à atividade da ALP, verificou-se que apenas o grupo tratado com silimarina apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo patológico (p < 0,05), nos demais grupos não foi observada diferença com o grupo APAP. Isso pode ser porque essa enzima não é um marcador específico do fígado e, portanto, a presença de uma alteração no nível de ALP nem sempre é indicativa de dano hepatocelular (31), mas quando há obstrução hepática do fluxo biliar pode ser elevado (32). Além disso, o tempo decorrido para a colheita da amostra após a administração de APAP no modelo de hepatotoxicidade utilizado não é suficiente para causar danos nesse nível.

Em termos gerais, os valores semelhantes foram observados nos parâmetros TGP e TGO nos animais tratados com as diferentes doses de extrato de *A. edulis* e nos tratados com silimarina, o que pode ser

presence of phenolic compounds, and it agrees with what was previously found in an *in vitro* study (7). The liver damage caused in the hepatotoxicity model used involves oxidative stress (30).

At this point it is worth mentioning that the role of phenolic compounds of natural origin in hepatoprotection has been reported (33). These compounds can stabilize the free radicals generated by inhibiting the formation and expression of inflammatory cytokines, interleukins, transforming growth factor β (TGF- β), and tumor necrosis factor α (34). Finally, the regulation of the expression of several genes has also been reported according to the hepatotoxicity model studied (33).

Conclusion

In this work we demonstrated that the ethanolic extract of *A. edulis* is safe to be used orally in the doses tested, it does not affect the general behavior or the general activity of mice. It has been observed that the *A. edulis* extract has antioxidant capacity, related to presence of total phenolic compounds such as tannins and flavonoids. Finally, according to the evidence obtained in the liver damage test induced by paracetamol in mice, the extract has hepatoprotective activity, which could be associated with its antioxidant activity.

devido às propriedades antioxidantes de *A. edulis* que está associada à presença de compostos fenólicos, e concorda com o que foi encontrado anteriormente num estudo *in vitro* (7). A lesão hepática causada no modelo de hepatotoxicidade utilizado envolve *stress* oxidativo (30).

A este propósito devemos referir que o papel dos compostos fenólicos de origem natural na hepatoproteção já se encontram descritos (33). Esses compostos podem estabilizar os radicais livres gerados pela inibição da formação e expressão de citocinas inflamatórias, interleucinas, fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fator de necrose tumoral α (34). Finalmente, a regulação da expressão de vários genes também foi descrita de acordo com o modelo de hepatotoxicidade estudado (33).

Conclusão

Neste estudo demonstramos que o extrato etanólico de *A. edulis* é seguro para administração oral nas doses testadas, não afetando o comportamento ou atividade geral dos murganhos. Observou-se que o extrato de *A. edulis* possui capacidade antioxidante, relacionada com a presença de compostos fenólicos totais, como taninos e flavonoides. Por fim, de acordo com os resultados obtidas no teste de lesão hepática induzido por paracetamol em murganhos, o extrato possui atividade hepatoprotetora, que pode estar associada à sua atividade antioxidante.

Authors' Contributions statement

All authors have made substantial contributions to this work, read the final manuscript, and approved the submission. AKG, JRC, MSS, MACB, LK collaborated in the concept and design of biological experiments, data acquisition, data analysis and interpretation, statistical analysis. LGM and AKG conducted the antioxidant experiments. MACB and LK drafted the manuscript. All authors were involved in critical revision and final approval.

Acknowledgements

The authors acknowledge Professor G. Delmás of the Department of Botany, Facultad de Ciencias Químicas, for plant collection and identification, and Mr. N. Kennedy for the English language revision.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

This research was supported by Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. AKG conducted the work during her master's program (MCQB) supported by CONACYT, Paraguay (PROCIENCIA POSG16-160).

Declaração de contribuições dos autores

Todos os autores fizeram contribuições substanciais para este trabalho, leram o manuscrito final e aprovaram a submissão. AKG, JRC, MSS, MACB, LK colaboraram na concepção e desenho de experimentos biológicos, aquisição de dados, análise e interpretação de dados, análise estatística. LGM e AKG realizaram os ensaios de antioxidantes. A escrita do manuscrito foi feita por MACB e LK. Todos os autores participaram da revisão crítica e aprovação final.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Professor G. Delmás, do Departamento de Botânica da Facultad de Ciencias Químicas pela recolha e identificação das plantas; ao Sr N. Kennedy pela ajuda na transversão do texto para língua inglesa.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflitos de interesse.

Financiamento

Esta investigação foi apoiada pela Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Assunção, Paraguai. A AKG realizou o trabalho durante o mestrado (MCQB) apoiado pela CONACYT, Paraguai (PROCIENCIA POSG16-160).

References / Referências

- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2022). Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. PMID: 30571059.
- Liu, X., Wang, H., Liang, X., & Roberts, M.S. (2017). Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. In: P. Muriel (ed.) *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* (Chapter 30, p 391-400). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00030-8>
- https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab_1
- Hernandez N, Pontet Y, Bessone F. (2020) Translating new knowledge on drug-induced liver injury into clinical practice. *Frontline gastroenterology*, 11(4), 303–310. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2018-101120>
- Díaz, M., González, A., Castro-Gamboa, I., Gonzalez, D., & Rossini, C. (2008). First record of l-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Carbohydrate Research*, 343(15), 2699-2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.07.014>
- Kujawska, M., Schmeda-Hirschmann G. (2021). The use of medicinal plants by Paraguayan migrants in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina, is based on Guaraní tradition, colonial and current plant knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 283, 114702. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114702.
- Hoffmann-Bohm, K., Lotter, H., Seligmann, O., & Wagner, H. (1992). Antihepatotoxic C-Glycosyl flavones from the Leaves of *Allophylus edulis* var. *edulis* and *gracilis*. *Planta Medica*, 58(06), 544-548. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961546>
- Mitchell, J. (1988). Acetaminophen Toxicity. *New England Journal of Medicine*, 319(24), 1601-1602. <https://doi.org/10.1056/nejm198812153192409>
- Dharmani, P., Mishra, P., Maurya, R., Singh Chauhan, V., & Palit, G. (2005). *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.011>
- Yajia, M., et al. (1999). Genotoxicity evaluation of *Allophylus edulis* (Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract. *Acta Horticulturae*, 501, 31-36. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1999.501.2>
- Castillo, L., González-Coloma, A., González, A., Díaz, M., Santos, E., Alonso-Paz, E., Bassagoda, M. J., & Rossini, C. (2009). Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.05.004>
- Signor, C., Benites, L., Pereira, U., dos Santos, P., Barros, S., de Melo, A., et al. (2015). Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity from leaves of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess.) Hieron. ex Niederl. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(11), 353-362. <https://doi.org/10.5897/ajpp2015.4270>
- Houghton, D.J.P. & Raman, A. (1998) Manual de laboratorio para el fraccionamiento de extractos naturales. Chapman y Hall, Londres, 199. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5809-5>
- Caballero, S.; Mereles, L.; Burgos-Edwards, A.; Alvarenga, N.; Coronel, E.; Villalba, R.; Heinichen, O. (2021). Nutritional and bioactive characterization of *Sicana odorifera* Naudim Vell. seeds by-products and its potential hepatoprotective properties in Swiss albino mice. *Biology* 10(12), 1351. <https://doi.org/10.3390/biology10121351>
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-calocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*, 152-178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, 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. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Mereles, L., Caballero, S., Burgos-Edwards, A., Benítez, M., Ferreira D., Coronel, E., et al. (2021). Extraction of total anthocyanins from *Sicana odorifera* black peel fruits growing in Paraguay for food applications. *Applied Sciences*, 11, 6026. doi.org/10.3390/app11136026
- National Research Council. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. (8th ed.). National Academies Press.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2002). Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*, 1-14. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- Roux, S., Sablé, E., & Porsolt, R. (2004). Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Current Protocols in Pharmacology*, 27(1), 10.10.1-10.10.23. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>
- Zavala-Flores, E., Goicochea-Lugo S., Arguro-Muñoz T., Adrianzen-Rodriguez S., Coronel-Bustamante G.O, Salazar-Granara A. (2013). Intestinal motility and nervous system effects dose-response curve for the interaction between *Jatropha curcas* L. and metoclopramide. *Acta Med Per*; 30(3), 120-127.
- Mossanen, J., & Tacke, F. (2015). Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Laboratory Animals*, 49(1_suppl), 30-36. <https://doi.org/10.1177/0023677215570992>
- Dufour, D., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S., Seeff L.B. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry*, 46(12), 2027-2049. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.12.2027>
- Strömme, J., & Eldjam, L. (1974). Scandinavian Standardizations of Enzyme Determination. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 33(4), 287–289.
- Arruda, G., Périco L.G.V., Scur M.C., Parpinelli R., Peretti R.F., Follador F.A.C. (2019). Phytochemical prospecting, antimicrobial activity, and acute toxicity of aqueous plant extract of two plant species *Allophylus edulis* (A. St. Hilaire, Cambessedes & A. Jussieu) RADLK ex WARM and *Matayba elaeagnoides* RADLK. *International Journal of New Technology and Research*, 5(2), 10-13. <https://doi.org/10.31871/ijntr.5.2.7>
- Bharat, R., & Gaikwad, D. (2016). The ethnobotany, phytochemistry and biological properties of *Allophylus* species used in traditional medicine: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (11), 664-682.
- Sobottka, A.M., Tessaro E., Maier da Silva S., Pedron M., Tortini Seffrin L. (2021). Polyphenol content and antioxidant potential of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil. et al.) Hieron. ex Niederl. and *Cupania vernalis* Cambess. (SAPINDACEAE) *Revista Árvore* 45(1), e4507. <https://doi.org/10.1590/1806-908820210000007>
- Trevizan, L. N. F., Nascimento, K. F. do, Santos, J. A., Kassuya, C. A. L., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. do C., Moreira F.M.F., Croda J., Formagio, A. S. N. (2016). Anti-inflammatory, antioxidant and anti- Mycobacterium tuberculosis activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 510–515. doi:10.1016/j.jep.2016.08.053
- Marwah, R., Fatope, M., Mahrooqi, R., Varma, G., Abadi, H., & Al-Burtamani, S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry*, 101(2), 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.001>
- Papackova Z., Heczkova M., Dankova H., Sticova E., Lodererova A., Bartonova L., Poruba M., Cahova M. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One*. 17, 13(1):e0191353. doi: 10.1371/journal.pone.0191353.
- Newsome, P. N., Cramb, R., Davison, S. M., Dillon, J. F., Foulerton, M., Godfrey, E. M., Hall, R., Harrower, U., Hudson, M., Langford, A., Mackie, A., Mitchell-Thain, R., Sennett, K., Sheron, N. C., Verne, J., Walmsley, M., & Yeoman, A. (2018). Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut*, 67(1), 6–19. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314924>
- Schumann, G., Bonora R., Ceriotti F., Féraud G., et al. (2002). IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Part 5. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Aspartate Aminotransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(7), 725-733. <https://doi.org/10.1515/cclm.2002.125>
- Saha, P., Talukdar, A., Nath, R., Sarker, S., Nahar, L., Sahu, J., & Choudhury, M. (2019). Role of natural phenolics in hepatoprotection: a mechanistic review and analysis of regulatory network of associated genes. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1-59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00509>
- Rani, V., Deep, G., Singh, R., Palle, K., & Yadav, U. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>