

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

**Roberta da Silva Jesus**

*Chenopodium ambrosioides* L. DO USO POPULAR AOS ENSAIOS PRÉ-  
CLÍNICOS: ANÁLISE QUÍMICA, POTENCIAL ANTI-  
INFLAMATÓRIO E ESTUDO DA TOXICIDADE

Santa Maria, RS, Brasil  
2019



**Roberta da Silva Jesus**

*Chenopodium ambrosioides* L. **DO USO POPULAR AOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS:  
ANÁLISE QUÍMICA, POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ESTUDO DA  
TOXICIDADE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS  
2019

Jesus, Roberta da Silva

Chenopodium ambrosioides L. DO USO POPULAR AOS  
ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS: ANÁLISE QUÍMICA, POTENCIAL ANTI  
INFLAMATÓRIO E ESTUDO DA TOXICIDADE / Roberta da Silva  
Jesus.- 2019.

136 p.; 30 cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

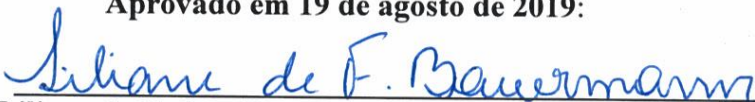
1. Erva-de-Santa-Maria 2. radiação ionizante 3.  
inflamação, 4. toxicidade I. Bauermann, Liliâne de  
Freitas II. Título.

**Roberta da Silva Jesus**

***Chenopodium ambrosioides* L. DO USO POPULAR AOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS: ANÁLISE QUÍMICA, POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ESTUDO DA TOXICIDADE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**

**Aprovado em 19 de agosto de 2019:**

  
**Liliane de Freitas Bauermann, Profa. Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Roberto Christ Vianna dos Santos, Prof. Dr. (UFSM)**

  
**Michele Rorato Sagrillo, Profa. Dra. (UFN)**

**Michel Mansur Machado, Prof. Dr. (UNIPAMPA)-avaliação por parecer**

  
**Maria Isabel Morgan Martins, Profª Drª. (ULBRA)**

Santa Maria, RS  
2019



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margareth Linde Athayde (in Memoriam) pelo exemplo de força, amor a profissão e estar sempre disposta a acolher e auxiliar. Agradeço por acreditar no meu potencial. Deixou saudades querida Professora.*





## AGRADECIMENTO

Acredito que tudo que acontece na vida tem um motivo maior, de uma força que nos guia sempre para o melhor caminho. Assim, agradeço a Deus a força maior que move o mundo por me guiar e colocar no meu caminho tantos corações bons.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Liliane de Freitas Bauermann por ser um desses corações bons que encontrei na vida, por me acolher desde o primeiro momento que nos conhecemos e ter permitido que eu fizesse parte de seu grupo de pesquisa quando perdemos nossa querida Prof<sup>a</sup> Margareth, obrigada por me guiar, amparar e orientar na realização dos meus sonhos Prof. Lili.

Falando em sonhos... eu tenho um agradecimento especial a Prof<sup>a</sup> Luciane Laporta, exemplo de amor a nossa profissão. Ela guiou meus passos na faculdade até a pós-graduação, não tenho palavras pra expressar a importância dela na minha vida. Agradeço por ser sempre tão disponível, pela amizade e carinho.

Agradeço a minha família por estar sempre comigo sendo a base forte do meu ser e das minhas decisões, pelo apoio sempre prestado a mim. Agradeço a minha Mãe Leila, que sonha meus sonhos, que me dá forças e me orienta em cada situação. “Por ela esse amor infinito, o amor mais bonito”, obrigada por não medir esforços para que eu seja feliz. A minha irmã Gabrielly, por ser mais que uma irmã pra mim, por estar sempre disposta a ajudar com uma determinação e bondade que só ela tem. Por ser riso e apoio, amizade e dedicação sem fim.

As minhas mães de coração Marta e Mariza por acreditarem sempre no meu potencial e me mostrarem que meus sonhos serão realizados e que estarão sempre comigo em qualquer situação. A tia Mariza me auxilia nesse estudo desde o início, é ela quem planta e colhe a Erva-de-Santa-Maria, obrigada por me ajudar na realização desse trabalho. Tia Marta sempre disposta a ajudar, acreditando em mim e no meu potencial, obrigada!

Agradeço aos meus amigos, em especial a Bruna pelas tardes de chá, leveza que trazem alegria a minha vida em qualquer situação, a Gabrieli por estar sempre comigo torcendo junto, sonhando junto e comemorando a cada conquista. A amizade de vocês é fundamental na minha vida, estarei sempre com vocês.

Agradeço aos que fizeram parte efetiva dessa jornada e que terminam ela comigo, segurando minha mão, pelo amor, apoio, paciência, por me mostrar que vale a pena seguir.

Agradeço aos meus colegas do LABFITO por estarem comigo numa das situações mais difíceis das nossas vidas, Thiele, Bianca, Robson, Mariana e Ritiel sem vocês o caminho seria mais difícil. Obrigado pela troca de idéias, pelo apoio e pela amizade de sempre. As minhas colegas e amigas que fiz no LAFEX Isabel, Rafaela, Dida, Camille e Fernanda, agradeço por toda ajuda prestada, pelo apoio e pela disposição em me ajudar sempre e principalmente pela amizade.

Agradeço aos amigos Portugueses que fiz no meu período de mobilidade, João, Mariana e Tânia meu dias foram mais leves e felizes tendo vocês comigo. Aos Professores da Universidade do Porto Paula, Patrícia e David, agradeço a acolhida certamente aprendi muito com vocês. Ao Rui agradeço por todo aprendizado e amizade.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, ao PPGCF-UFSM pela oportunidade de realizar esta tese.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que o trabalho fosse possível.

A todos a minha mais sincera gratidão.



“Amor dará e receberá. Do braço, mão; da boca vogal”.  
Mantra - Nando Reis



## RESUMO

### *Chenopodium ambrosioides* L. DO USO POPULAR AOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS: ANÁLISE QUÍMICA, POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ESTUDO DA TOXICIDADE

AUTORA: Roberta da Silva Jesus

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liliane de Freitas Bauermann

*Chenopodium ambrosioides* L., conhecida popularmente como Erva-de-santa-maria, é amplamente utilizada na medicina popular nas mais diversas enfermidades, anti-inflamatória na cura de feridas, cicatrizante, entre outros. No ano de 2009, foi inserida na RENISUS, devido à sua ampla utilização popular. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização química de extratos irradiados e não irradiados de *C. ambrosioides* L., bem como elucidar os mecanismos de ação envolvidos na possível atividade anti-inflamatória da espécie e determinar sua segurança através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. O perfil cromatográfico dos extratos irradiados e não-irradiados foi obtido por CLAE-DAD, com a finalidade de comparar sua bioatividade e verificar possíveis alterações no perfil químico causado pela radiação gama. Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil cromatográfico qualitativo, mas foram encontradas diferenças quantitativas entre os compostos identificados nos extratos. O extrato da planta irradiada (EPI) apresentou um aumento de derivados de canferol e derivados de quercetina cerca de 20 vezes do que outros extratos. Todas as amostras testadas foram eficazes na inibição da LOX a 0,400 - 0,488 mg/mL. Em relação ao radical óxido nítrico, o extrato não irradiado (ENI) apresentou o melhor potencial de eliminação (valor IC<sub>50</sub> de 0,431 mg / mL). As amostras também foram avaliadas quanto à sua toxicidade e potencial anti-inflamatório nos macrófagos RAW 264.7, apresentando uma concentração segura de até 0,250 mg / mL e o ENI foi o mais efetivo na redução do NO no ensaio celular (IC<sub>50</sub> 0,201 ± 0,029 mg / mL). Os resultados obtidos nas análises *in vitro* elegeram o extrato não-irradiado para o estudo *in vivo*, já que o mesmo apresentou uma melhor bioatividade nos ensaios realizados. A análise de massas revelou a presença de 6-hidroxicumarina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quercetina-3-O-rutinosídeo, apigenina, quercitrina, quercitina e canferol. No estudo de toxicidade oral aguda, o extrato de *C. ambrosioides* foi classificado como seguro (categoria 5) de acordo com as diretrizes da OECD. A administração do extrato em doses repetidas (28 dias) aumentou apenas a atividade da enzima AST, observada em fêmeas tratadas com 50 mg / kg. Outros parâmetros toxicológicos não foram alterados pela administração do extrato (50-200 mg / kg) em machos e fêmeas. *C. ambrosioides* e *B. serrata* reduziram o edema de orelha induzido por óleo de cróton em 47,18 ± 4,59% e 34,23 ± 4,78% (em 1mg / orelha), respectivamente. Os mesmos tratamentos também reduziram a infiltração de células inflamatórias induzida por óleo de cróton (observada pela atividade da mieloperoxidase) em 40,71 ± 14,71 para *C. ambrosioides* (1 mg / orelha) e 35,93 ± 9,97% para *B. serrata* (1 mg / orelha). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram o perfil de segurança de *C. ambrosioides* e seu potencial como agente anti-inflamatório tópico no tratamento de distúrbios inflamatórios da pele, justificando seu uso na medicina popular.

**Palavras-chave:** Erva-de-Santa-Maria, radiação ionizante, inflamação, toxicidade.



## ABSTRACT

### ***Chenopodium ambrosioides* L. FROM POPULAR USE TO PRE-CLINICAL ASSAYS: CHEMICAL CHARACTERIZATION, SAFETY AND DETERMINATION OF ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY**

AUTHOR: Roberta da Silva Jesus

ADVISOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liliane de Freitas Bauermann

*Chenopodium ambrosioides* L., popularly known as Erva-de-Santa-Maria, is widely used in folk medicine against many diseases, as anti-inflammatory, healing, among others. In 2009, it was inserted in RENISUS, due to its wide popular use. The aim of this study was to perform the chemical characterization of the irradiated and non-irradiated extracts of *C. ambrosioides* L., as to elucidate the mechanisms of action involved in the possible anti-inflammatory activity of this species and to determine its safety through *in vitro* and *in vivo* assays. The chromatographic profile of the irradiated and non-irradiated extracts was obtained by HPLC-DAD, in order to compare their bioactivity and to verify possible changes in the chemical profile caused by gamma radiation. All samples presented the same qualitative chromatographic profile, but quantitative differences were found between the compounds identified in the extracts. The irradiated plant extract (IPE) showed an increase of canferol derivatives and quercetin derivatives about 20 times more than the other extract. All samples tested were effective in inhibiting LOX at 0.400 - 0.488 mg/mL. Regarding the nitric oxide radical, the non-irradiated plant extract (NIPE) presented the best elimination potential (IC<sub>50</sub> value of 0.431 mg / mL). Samples were also evaluated for their toxicity and anti-inflammatory potential in RAW 264.7 macrophages, presenting a safe concentration up to 0.250 mg / mL and NIPE was the most effective in reducing NO in the cell assay (IC<sub>50</sub> 0.201 ± 0.029 mg / mL). The results obtained in the *in vitro* analysis appointed the non-irradiated extract for the *in vivo* study, since it presented a better bioactivity in the performed assays. Mass analysis revealed the presence of 6-hydroxycoumarin, p-coumaric acid, ferulic acid, quercetin-3-*O*-rutinoside, apigenin, quercitrin, quercetin and canferol. In the acute oral toxicity study, *C. ambrosioides* extract was classified as safe (category 5) according to OECD guidelines. Administration of the extract at repeated doses (28 days) only increased AST enzyme activity in females treated with 50 mg / kg. Other toxicological parameters were not altered by extract administration (50-200 mg / kg) in males and females. *C. ambrosioides* and *B. serrata* reduced ear edema induced by croton oil by 47.18 ± 4.59% and 34.23 ± 4.78% (by 1mg / ear), respectively. The same treatments also reduced croton oil-induced inflammatory cell infiltration (observed by myeloperoxidase activity) by 40.71 ± 14.71 for *C. ambrosioides* (1 mg / ear) and 35.93 ± 9.97% for *B. serrata* (1 mg / ear). The results obtained in the present study demonstrate the safety profile of *C. ambrosioides* and its potential as a topical anti-inflammatory agent in the treatment of inflammatory skin disorders, justifying its use in folk medicine.

**Keywords:** Erva-de-Santa-Maria; ionizing radiation; inflammation; toxicity.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar de <i>C.ambrosioides</i> L.....	34
Figura 2 – Aplicações de <i>C. ambrosioides</i> L. na medicina popular em diferentes estados brasileiros.....	35
Figura 3 – Cascata do ácido araquidônico, na síntese de eicosanoides.....	42

### Manuscrito 1

Figura 1 – Perfil dos compostos fenólicos do extrato não-irradiado de <i>C. ambrosioides</i> L.....	69
Figura 2A – Potencial de inibição dos extratos de <i>C. ambrosioides</i> L. frente a lipoxigenase (LOX) <i>in vitro</i> .....	72
Figura 2B – Ação sequestrante do óxido nítrico <i>in vitro</i> por extratos de <i>C. ambrosioides</i> L.....	72
Figura 3 – Viabilidade dos macrófagos RAW 264,7 tratados com extratos irradiados e não-irradiados de <i>C. ambrosioides</i> L.....	72
Figura 4 – Efeito nos níveis de óxido nítrico dos macrófagos RAW 264,7 pré-tratados (por 2h) com extratos irradiados e não-irradiados de <i>C. ambrosioides</i> L., seguido de co-tratamento com LPS (por 22h).....	73

### Manuscrito 2

Figura 1 – Composição química do extrato liofilizado de <i>C. ambrosioides</i> L. por análise de massas.....	100
Figura 2 – Parâmetros bioquímicos após tratamento com doses repetidas do extrato liofilizado de <i>C. ambrosioides</i> L. (28 dias) em ratos Wistar.....	104
Figura 3 – Efeitos da administração de doses repetidas do extrato liofilizado de <i>C. ambrosioides</i> L. na produção do MDA em fígado e rins de ratos Wistar.....	105
Figura 4 – Efeito antiedematogênico dos extratos brutos de <i>C. ambrosioides</i> (0,01-1 mg/orelha) e <i>B. serrata</i> (1 mg/orelha) sobre um modelo de inflamação de pele induzida pela aplicação de óleo de cróton.....	107
Figura 5 – Efeito dos extratos brutos de <i>C. ambrosioides</i> (0,01-1 mg/orelha) e <i>B. serrata</i> (1 mg/orelha) aplicados topicamente sobre a atividade da enzima MPO em amostras de orelha de camundongos após inflamação de pele aguda induzida por óleo de cróton.....	108



## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito 1

- Tabela 1 – Equação linear, limite de detecção e quantificação para identificação de compostos de *C. ambrosioides* L.....66
- Tabela 2 – Compostos fenólicos do extrato não-irradiado, extrato da planta irradiada e extrato irradiado de *C. ambrosioides*.....70
- Tabela 3 – Efeitos dos extratos irradiados e não irradiados de *C. ambrosioides* L em mediadores inflamatórios.....74

### Manuscrito 2

- Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos e hematológicos alterados após a administração aguda do extrato liofilizado de *C. ambrosioides* na dose de 2000mg/kg em ratos.....101
- Tabela 2 – Parâmetros eritrocitários após 28 dias de tratamento com o extrato liofilizado de *C. ambrosioides* L. nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg em ratos.....102
- Tabela 3 – Parâmetros leucocitários após 28 dias de tratamento com o extrato liofilizado de *C. ambrosioides* L. nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg em ratos.....103



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido araquidônico
- AST – Aminotransferase
- ALT – Alanina aminotransferase
- EO – Estresse oxidativo
- RL – Radical livre
- ENI – Extrato não-irradiado
- EI – Extrato irradiado
- EPI – Extrato da planta irradiada
- LPO – Lipoperoxidação
- MDA – Malondialdeído
- GGT – Gama - glutamiltranspeptidase
- FA – Fosfatase alcalina
- FDA – *Do inglês: Food and drug Administration*
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais
- CG – Cromatografia gasosa
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CIM – Concentração inibitória mínima
- DL<sub>50</sub> – Dose letal 50
- IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%
- DPPH – 2,2 diphenyl-1-picrylhydazyl
- Gy/kGy – Gray/ kGy
- NF-κβ – Fator nuclear kappa beta
- COX 1 – COX 2 – Cicloxigenases 1 e 2
- LOX – Lipoxigenase
- OECD – *Do inglês: Organization for economic Co-operation and Development*
- RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS
- ON – Óxido nítrico
- LPS – Lipopolissacarídeo
- HPETEs – Ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos
- HETEs – Ácidos hidroxieicosatetraenoicos



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	33
2.1 DESCRIÇÃO DA PLANTA.....	33
2.1.1 Família Amaranthaceae e espécie <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	33
2.1.2 Estudos descritos para <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	36
2.2 A QUÍMICA DAS PLANTAS MEDICINAIS E SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO.....	37
2.2.1 Metabólitos secundários: Definição e funcionalidade.....	37
2.2.2 Compostos fenólicos: Estudos referentes ao potencial farmacológico.....	38
2.3 A TECNOLOGIA ALIADA A POTENCIALIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: RADIAÇÃO GAMA.....	39
2.3.1 Aplicações.....	39
2.3.2 Alteração do conteúdo fitoquímico em resposta a radiação.....	40
2.4 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS E FITOCOMPOSTOS ASSOCIADOS A ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA....	41
2.4.1 Processos inflamatórios.....	41
2.4.2 Potencial anti-inflamatório dos compostos fenólicos.....	44
2.5 A TOXICIDADE PROVENIENTE DAS ESPÉCIES OXIDANTES E DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	45
2.5.1 Espécies oxidantes e estresse oxidativo.....	45
2.5.2 Lipoperoxidação.....	46
2.6 PLANTAS MEDICINAIS E SEU POTENCIAL TÓXICO.....	47
2.5.1 Modelos experimentais toxicológicos em animais: Um panorama.....	48
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 OBJETIVO GERAL.....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
CAPÍTULO 1: Análise química comparativa e potencial anti-inflamatório <i>in vitro</i> de extratos de <i>C. ambrosioides</i> L. submetidos a radiação ionizante.....	57
Manuscrito 1: Influence of gamma radiation on the chemical composition of <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. and its anti-inflammatory potential.....	61
CAPÍTULO 2: Segurança e potencial anti-inflamatório do extrato liofilizado de <i>C. ambrosioides</i> L. através de modelos <i>in vivo</i> .....	87
Manuscrito 2: Can lyophilized extract of <i>C. ambrosioides</i> L. reduces croton oil-induced skin inflammation without causing toxicity in animals?.....	91
4 DISCUSSÃO GERAL.....	119
5 CONCLUSÃO.....	126
REFERENCIAS.....	129

ANEXO 1: CARTAS DE APROVAÇÃO CEUA-UFSM.....140-141







## 1 INTRODUÇÃO

A busca pela cura de doenças a partir do uso de plantas é possivelmente uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais pelos humanos, pois é uma prática exercida pelos povos desde os tempos antigos. Atualmente, estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) afirmam que cerca de 80% da população utiliza os princípios da medicina tradicional na atenção primária à saúde, recomendando, desse modo, o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais para fins terapêuticos (BRASIL, 2009; PETROVSKA, 2012; PIO et al., 2018).

Medicamentos obtidos exclusivamente de ativos vegetais, que possuam uma caracterização química e atividade farmacológica definida, são denominados fitoterápicos. Esses podem ser tão eficientes quanto os fármacos sintetizados quimicamente, porém a transformação de uma matéria prima de origem vegetal em medicamento deve preservar a integridade química e farmacológica da planta medicinal, resultando assim na garantia da ação biológica e consequentemente no valor terapêutico (COSTA et al., 2011). Em suma, estudos prévios relativos a aspectos agrônômicos, botânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos são fundamentais para garantir a segurança de utilização e confiabilidade da ação biológica, desses produtos (ANVISA, 2006).

As características fitoquímicas conferem as plantas potenciais atividades farmacológicas, inclusive sobre agentes etiológicos causadores de enfermidades de grande impacto epidemiológico e econômico. Com a avaliação de extratos vegetais é possível detectar frações bioativas da planta (SILVEIRA et al., 2009). Desta forma, o uso de plantas medicinais requer o desenvolvimento de métodos a fim de facilitar a avaliação científica e posterior caracterização de seu valor medicinal. As características farmacológicas das espécies vegetais são provenientes de compostos químicos formados, degradados ou transformados a partir do metabolismo das mesmas, esses compostos são denominados metabólitos (SANTOS et al., 2017; HOSSEINI et al., 2017).

Os metabólitos secundários são compostos químicos, produzidos por necessidades ecológicas e possibilidades biosintéticas que variam de acordo com cada espécie vegetal. Fatores como clima, tipo de solo e época de colheita da planta, podem interferir na produção desses compostos originários do metabolismo secundário das plantas, os quais possuem como função adaptar o vegetal ao meio, atrair polinizadores, proteger contra raios UV, entre outros. Representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológico. Dentre os

principais compostos derivados desse metabolismo estão: polifenóis, alcalóides, cumarinas, antraquinonas, taninos, óleos essenciais e saponinas (SIMÕES et al., 2017).

Com o intuito de potencializar a concentração de metabólitos secundários responsáveis pela ação farmacológica presentes nas plantas medicinais, estudos recentes mostram uma inovadora alternativa para essa finalidade: a radiação ionizante (VARDHRAN e SHUKLA, 2017). A radiação gama é um método rápido e novo para aumentar os caracteres qualitativos e quantitativos de muitas plantas, tem sido amplamente utilizada na medicina e na indústria alimentícia como alternativa para desacelerar o processo de degradação de alguns alimentos (SANTOS, AMARAL e SILVA, 2018). Estudos vem sendo publicados tendo como foco que baixas doses de radiação ionizante são capazes de potencializar o crescimento celular e a atividade enzimática nas plantas (CHAKRAVARTY et al., 2001).

No Brasil, o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais é a base da medicina popular. Derivado de uma mistura de culturas indígenas, europeias e africanas, a prática não é realizada exclusivamente por comunidades rurais, mas também por uma variedade popular pertencente a todo o território brasileiro. Os métodos de preparação mais comuns são decocção, infusão e emplastos essas preparações são administradas por via oral e tópica respectivamente. As plantas medicinais são, geralmente, consideradas seguras pela população, no entanto, isso pode ser um equívoco, já que sua ação pode causar efeitos colaterais, e por esse motivo, a pesquisa com espécies utilizadas para esse fim se faz muito importante para comprovação de sua eficácia (BRONDANI et al., 2017; HOSSEINI et al., 2017; COELHO et al., 2018).

Em 2009, o Ministério da Saúde do Brasil criou a Lista Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), com o intuito de buscar tratamento alternativo para doenças que afetam a população. A lista é composta por 71 espécies de plantas nativas de diferentes biomas que são comumente utilizadas ou cujos efeitos foram cientificamente comprovados. Diversas espécies estão sendo pesquisadas desde o ano de criação do projeto, para contribuir com a assistência farmacêutica, atuando na promoção da segurança e eficácia de plantas medicinais e fitoterápicos, usados na atenção básica em saúde (BRASIL, 2009).

Desse modo, segundo Valério e colaboradores (2015), por ser uma espécie muito utilizada no meio popular para tratar diferentes doenças, e por apresentar bom potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, *Chenopodium ambrosioides* L. foi inserida na lista do RENISUS e está entre as plantas que merecem incentivo à pesquisa. Tradicionalmente conhecida como Erva-de-Santa-Maria, na medicina popular é utilizada como antirreumático,

antipirético, antimicrobiano, fungicida, anti-úlceras e cicatrizante (COSTA e TAVARES, 2006).

Devido à grande utilização popular e as diferentes atividades biológicas relacionadas a essa espécie, principalmente de ordem inflamatória, sua inserção no RENISUS e a necessidade de novas fontes com potencial farmacológico, é de grande importância a identificação dos compostos químicos de *C. ambrosioides* L. e elucidação da segurança através de ensaios de toxicidade, afim de possibilitar uma maior compreensão sobre seu uso popular. Vale salientar também, que a avaliação da concentração de compostos após o tratamento da planta e extratos submetidos a radiação gama, é um dado interessante para verificar se a radiação é capaz de causar alterações químicas na amostra e se a possível mudança interfere em sua bioatividade.



**REVISÃO DA LITERATURA**

---





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DESCRIÇÃO DA PLANTA

#### 2.1.1 Família Amaranthaceae e espécie *Chenopodium ambrosioides* L.

A espécie do presente estudo faz parte da família Amaranthaceae, a qual apresenta cerca de 169 gêneros e aproximadamente 2360 espécies. Nesse grupo se encontra a subfamília Chenopodiaceae, sendo seus principais gêneros *Atriplex* L. (300 spp.), *Gomphrena* L. (120 spp.), *Salsola* L. (120 spp.), *Alternanthera* Forssk. (100 spp.), *Chenopodium* L. (100 spp.), *Ptilotus* R. Br. (100 spp.), *Suaeda* Forssk (100 spp.), *Iresine* R. Browne (80 spp.), *Amaranthus* L. (60 spp.), *Corispermum* L. (60 spp.) e *Celosia* L. (50 spp.). Ervas e subarbustos são a grande parte dos exemplares na família, possuindo folhas alternas ou opostas, simples e sem estípulas, já os frutos podem ser aquênios, utrículos ou cápsulas. No Brasil são encontradas 145 espécies, distribuídas em 19 gêneros, sendo 71 endêmicas de diferentes regiões e biomas brasileiros (LORENZI e MATOS, 2002).

*Chenopodium ambrosioides* L. (*Dysphania ambrosioides*) representada na figura 1, possui flores pequenas e de coloração verde clara, verde amarelada ou vermelha, as quais se inserem nas folhas superiores e florescem anualmente entre janeiro e abril. Em relação aos frutos, são do tipo aquênio, bastante pequenos, esféricos, pretos e comumente confundidos com sementes (KISMAN, 1991; LORENZI e MATOS, 2002). Apresenta-se como arbusto perene, muito ramificado e com até um metro de altura, fortemente aromático, de folhas simples e alternas, e com flores pequenas dispostas em espigas densas (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 1 – Exemplar de *Chenopodium ambrosioides* L.

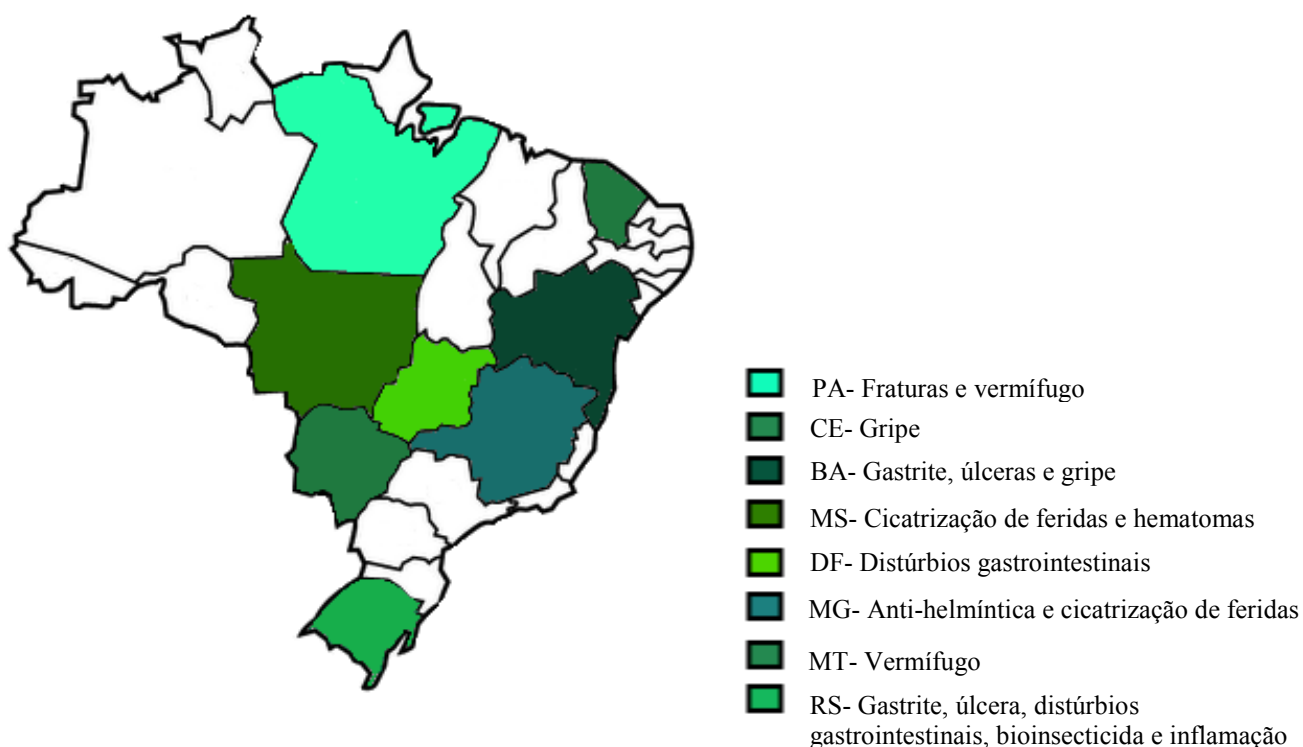


Fonte: Adaptado do *Weed Herbarium*, disponível em: <https://extension.umass.edu/landscape/weeds/chenopodium-ambrosioides>

A espécie *Chenopodium ambrosioides* L. é conhecida entre a população como Erva-de-Santa-Maria, mastruz ou mastruço, ambrósia, quenopódio, entre outros, se destaca como uma das principais plantas medicinais utilizadas popularmente, com grande variabilidade de aplicações. É originária da América Central e América do Sul, podendo existir no México, em algumas regiões da Europa e Ásia. No Brasil é nativa no Sul e no Sudeste, onde é considerada invasora de culturas, no entanto, pode ser encontrada em diversas regiões brasileiras onde o uso é muito difundido na medicina popular conforme a figura 2 (LORENZI e MATOS, 2002; PENIDO et al., 2016).

A referida espécie vegetal é amplamente utilizada na medicina popular para tratar as mais diversas enfermidades, tais como úlceras estomacais, picadas de inseto, na forma de emplastos para a cura de feridas, anti-helmíntica, laxativa, digestiva e bioinseticida (OLIVEIRA, FERREIRA e BARROSO, 2014).

Figura 2 – Aplicações de *Chenopodium ambrosioides* L. na medicina popular em diferentes estados brasileiros



Fonte: A autora

Com base na ampla utilização popular para as mais diversas enfermidades e devido a ausência de monografia para *C. ambrosioides* L. no ano de 2009, a espécie foi integrada à lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS). Na qual, foi destacada como planta de grande interesse a pesquisa científica, fato que ratifica a necessidade de mais estudos com a espécie. Tal incentivo tem a finalidade de identificar compostos relevantes à manutenção da saúde ou a cura de doenças, além de promover a utilização segura da planta pela população (BRASIL, 2009).

### 2.1.2 Estudos descritos para *Chenopodium ambrosioides* L.

Ribeiro (2008) verificou que o sumo das folhas e galhos da espécie apresentou atividade anti-inflamatória em estudos de cicatrização de feridas em ratos Wistar. Patricio et al. (2008) cita que a Erva-de-santa-maria apresenta atividade leishmanicida, comprovada através da cura de feridas ocasionadas pela leishmaniose em camundongos.

*C. ambrosioides* L. é amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de distúrbios gástricos, também conhecida pela população por sua ação antiúlcera motivou a realização de análises referentes ao seu potencial bactericida frente a *Helicobacter pylori* em um trabalho publicado por Ye et al., 2015 a planta demonstrou atividade bactericida *in vitro* e *in vivo*, sendo que o CIM obtido na sua ação bactericida *in vitro* foi de 16mg/L e seu efeito foi proporcional a dose testada.

Pandey e colaboradores (2012) testaram *in vitro* o efeito do óleo essencial proveniente da Erva-de-santa-maria contra duas bactérias fitopatogênicas, *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas putida*, que causam doenças pós-colheita em frutas e verduras. Partindo do ensaio microbiológico, os autores constataram que o óleo de *C. ambrosioides* L. pode ser considerado um excelente agente antibacteriano para o tratamento dessas patologias. O estudo revelou também a presença de 125 compostos presentes no óleo desta espécie vegetal, dos quais 14 foram reconhecidas, dentre os constituintes de maior importância estão:  $\alpha$  - terpineno (37,74%), *p*-cimeno (16,71%) e ascaridol (38,03%), associados à capacidade antibacteriana da espécie.

Estudos referentes à composição química de *C. ambrosioides* L. ainda são escassos. Barros e colaboradores (2013) identificaram na espécie açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, ácidos graxos insaturados e tocoferóis. Destacaram-se pela elevada concentração de Quercetina-3-*O*-rutinosídeo ( $204.95 \pm 6.39$  mg/100 g FS), Canferol 3-*O*-rutinosídeo ( $74.82 \pm 2.29$  mg/100 g FS), Canferol dirhamnosídeo-*O*-pentosídeo ( $95.89 \pm 1.64$  mg/100 g FS), de modo geral os autores relacionam a presença destes compostos com a atividade antioxidante da espécie.

Em estudo descrito por Degenhardt et al., (2016) foram identificados dois compostos principais: *p*-cimeno (42,32%) e ascaridol (49,77%) no óleo essencial de *C. ambrosioides* L. através de cromatografia gasosa (CG). Tais resultados nortearam a realização de ensaios de toxicidade com óleo essencial da espécie. Uma atividade citotóxica significativa foi encontrada para o óleo essencial ( $IC_{50} = 1,0$  g/mL) para células Raji (Linfoma de Burkitt), tal fator está possivelmente relacionado à grande quantidade de ascaridol no óleo essencial, uma

vez que o outro composto principal, *p*-cimeno, é reconhecido como um potente anti-inflamatório e tem uma baixa atividade citotóxica.

Calado e colaboradores (2015) publicaram resultados referentes a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* em modelo experimental de osteoartrite *in vivo*, extratos da planta foram capazes de reduzir a inflamação sinovial e as alterações comportamentais ocasionadas pela dor. No mesmo segmento, um estudo realizado por Soares et al., (2015) apresentou que o extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* L. tem efeitos no metabolismo ósseo alterando as proteínas e enzimas do sangue, evitando a perda óssea ocasionada pela osteoporose.

Estudos realizados por Jesus e colaboradores (2018) investigaram a atividade do extrato bruto e frações clorofórmio, acetato de etila e butanol de *C. ambrosioides* frente a micro-organismos patogênicos de relevância clínica, sendo eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Candidas albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse mesmo estudo, foi identificada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) a presença de três flavonoides: rutina, quercetina e crisina. Os referidos flavonoides são conhecidos entre outras ações, pelo seu potencial farmacológico.

## 2.2 A QUÍMICA DAS PLANTAS MEDICINAIS E SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO

### 2.2.1 Metabólitos secundários: Definição e funcionalidade

Os metabólitos secundários são compostos químicos, produzidos por necessidades ecológicas e possibilidades biosintéticas que variam de acordo com cada espécie vegetal. Fatores como clima, tipo de solo e época de colheita da planta, podem interferir na produção desses compostos originários do metabolismo secundário das plantas, os quais possuem como função adaptar o vegetal ao meio, atrair polinizadores, proteger contra raios UV, entre outros. Representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológico, dentre os principais compostos derivados desse metabolismo estão: polifenóis, alcalóides, cumarinas, antraquinonas, taninos, óleos essenciais e saponinas (SIMÕES et al., 2017).

Pesquisas nas diversas áreas da ciência tem sido motivadas pela elevada diversidade de metabólitos vegetais identificados e caracterizados através de métodos entre eles os cromatográficos, por sua importância na área farmacêutica, devido sua fonte promissora de moléculas bioativas (RHODES, 1994).

É de grande importância o conhecimento sobre os fatores que influenciam a composição química das espécies vegetais, e em que partes da planta contém a maior concentração de metabólitos potencialmente ativos, afim de verificar os componentes fitoquímicos de maior atividade e otimizar a qualidade das análises realizadas (CZELUSNIAK et al., 2012).

### **2.2.2 Compostos fenólicos: Estudos referentes ao potencial farmacológico**

Dentre os produtos do metabolismo secundário das plantas está uma importante classe de polifenóis de vasto potencial farmacológico, os flavonoides. Tal classe de compostos são sintetizados através da via dos fenilpropanóides, também conhecida pela via do ácido chiquímico e pela atividade da enzima fenilalanina amônia liase, podem-se encontrar flavonoides sob diversas formas estruturais (SIMÕES et al., 2017). De modo geral, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, o qual constitui de duas fenilas ligadas por uma cadeia de 3 carbonos (VOGT, 2010; SIMÕES et al., 2017).

Os compostos dessa classe possuem atividade farmacológica relatada na literatura. Os derivados do canferol e seus glicosídeos são conhecidos por seu potencial anti-inflamatório, antiviral, antioxidante e até mesmo na redução da proliferação de células cancerígenas (hepáticas e do cólon) em modelo *in vivo* (WANG et al., 2018).

A quercetina é ativa contra o vírus da herpes simples do tipo 1 e contra o vírus da dengue tipo 2 em células da linhagem VERO, além de apresentar importante potencial inibitório da lipoperoxidação (KUMAR e PANDEY, 2013). O efeito anti-inflamatório e antiedema também são atribuídas a quercetina e seus derivados (CHOI et al., 2012; CADEO et al., 2013).

Dentre os compostos com atividade farmacológica importante e diversificada presente em espécies vegetais está a rutina. Essa é conhecida por sua ação antioxidante, anti-inflamatória, alguns estudos relataram ainda a ação antinoceptiva periférica e central em modelo experimental em camundongos (SELVARAJ et al., 2014).

O ácido cumárico é derivado do ácido cinâmico, é encontrado na forma de três isômeros: ácidos *o*-cumárico, *m*-cumárico e *p*-cumárico (p-CA), sendo este o mais encontrado na natureza. Estudos atribuem a esse composto a atividade antioxidante, anti-inflamatória,

além da atividade antidiabética melhora da função das células beta do pâncreas através do aumento da expressão dos transportadores da glicose (FERREIRA et al., 2018).

O ácido ferúlico, outro derivado do ácido cinâmico, também possui aplicações farmacológicas conhecidas entre elas está o potencial antioxidante, antitrombótico, anti-inflamatório, sendo ativo contra células tumorais da pele, pulmão, cólon e mama (KUMAR e PRUTHI, 2014; MOLDOVAN et al., 2017; ZADUNSCA, et al., 2018).

O enriquecimento de compostos bioativos derivados de plantas, pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos produtos de interesse farmacêutico. Porém, a baixa produtividade vegetal desses compostos é um fator limitante na sua obtenção. Assim, o conhecimento científico aliado a tecnologia pode promover o estudo de novas alternativas com o objetivo de enriquecimento e garantia de uma produção sustentável desses metabólitos.

## 2.3 A TECNOLOGIA ALIADA A POTENCIALIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: RADIAÇÃO GAMA

### 2.3.1 Aplicações

A radiação gama ou radiação ionizante se dá através de ondas eletromagnéticas, que possuem energia suficiente para desprender elétrons de átomos e moléculas. Tal efeito, promove uma alteração na conformação estrutural das moléculas em resposta a radiação (TOPUZ e OZDEMIR, 2004).

Em nosso cotidiano, a radiação ionizante está presente na medicina, utilizada no tratamento de tumores através da radioterapia, na indústria de medicamentos é uma alternativa ao óxido de etileno, utilizado no processo de esterilização de embalagens e insumos, e na indústria alimentar promove a conservação de alimentos através da inativação de enzimas responsáveis por sua degradação (MOLLINS, 2001; SÁDECKÁ, 2007).

A unidade denominada Gray (Gy) se fundamenta na quantidade de energia de radiação absorvida por quilograma de tecido, na indústria de alimentos para fins de esterilização, a dose máxima permitida de radiação capaz de garantir a segurança é de 10kGy de acordo com a Diretiva de 22 de fevereiro de 1999, da legislação europeia.

A radiação gama tem sido muito utilizada no processamento de alimentos, devido seus efeitos positivos na preservação e na redução de perdas naturais causadas por processos como: brotamento, maturação e envelhecimento, eliminando toxinas e parasitas, preservando as

características sensoriais dos alimentos. É considerada como um processo seguro, já que não gera produtos radioativos e reduz a necessidade de conservantes e técnicas tradicionalmente utilizadas na indústria. Estudos vem sendo realizados com a finalidade de aliar a radiação ionizante ao enriquecimento fitoquímico de plantas e extratos vegetais (SDECKÁ, 2007; PEREIRA et al., 2017).

### 2.3.2 Alteração do conteúdo fitoquímico em resposta a radiação

A radiação gama é considerada como um método rápido e novo para aumentar os caracteres qualitativos e quantitativos de muitas plantas, tem sido amplamente utilizada em biologia e medicina, estudos têm mostrado que baixas doses de radiação ionizante aplicadas em plantas fotossintéticas potencializam o crescimento celular, a proliferação celular, a taxa de germinação, a atividade enzimática e a resistência ao estresse (CHAKRAVARTY et al., 2001).

Estudo realizado por Taheri e colaboradores (2014) mostrou que a radiação de extratos de *Curcuma alismatifolia* na dose de 20 Gy melhorou a qualidade e quantidade de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos e flavonoides que apresentaram um aumento de 51% e 78,2% respectivamente, quando comparados a extratos não-irradiados mostrando que a radiação ionizante pode ser um importante aliado para o aumento de compostos fitoquímicos com potencial farmacológico.

Outros estudos confirmam a ação benéfica da radiação sobre extratos vegetais, resultados obtidos em estudo realizado por Santos et al., (2014) indicam que os extratos de folhas de *A. occidentale* irradiados na dose de 10 kGy apresentam forte ação antioxidante frente ao radical DPPH e poder redutor o que possibilita utilizar extratos de *A. occidentale* visando a redução de processos oxidativos. Em contrapartida, pesquisa publicada por Gumos et al., (2011) apresenta o aumento de compostos fenólicos ocasionados pela radiação gama nas seguintes espécies vegetais: *Satureja hortensis*, *Thumus vulgaris*, *Thymbra spicata* irradiadas na dose de 5kGy. No entanto, tal aumento nos compostos não foi capaz de melhorar o potencial de captura do radical DPPH das amostras após a irradiação.

Em estudo realizado por Pereira et al., (2015) extratos de *Ginkgo biloba* L. foram submetidos a diferentes doses de radiação (0 a 10 kGy), e posteriormente as amostras foram analisadas por CLAE-DAD. Pode-se perceber que extratos irradiados na dose de 1kGy apresentaram uma diminuição na concentração de alguns derivados de quercetina e canferol, quando comparados aos extratos não-irradiados. No entanto, na dose de 10kGy os extratos



apresentaram um aumento significativo na concentração dos compostos fenólicos, os autores atribuem tal resultado a mecanismos complexos ainda não definidos.

Dentre as aplicações da radiação ionizante, está a capacidade de conservação de alimentos. Recentemente foi publicado um estudo a respeito do tempo de estocagem de ervas aromáticas submetidas a radiação, nesse trabalho foram verificadas a preservação das características fitoquímicas durante um período de 12 e 18 meses. De acordo com os resultados, a tecnologia parece ser adequada apenas para amostras armazenadas durante 12 meses (PEREIRA et al., 2018).

Em relação a bioatividade de amostras irradiadas Song et al., (2018) verificou o efeito antimelanogênico do extrato de *Panax ginseng Meyer*, o qual foi irradiado em várias doses (10, 30, 50, 70 e 100 kGy). Os autores atribuem o maior efeito antioxidante e a maior inibição de enzimas melanogênicas as amostras tratadas na dose de 100kGy, sugerindo a possível inserção do extrato irradiado em produtos tópicos.

É interessante a realização de estudos pré-clínicos utilizando extratos vegetais submetidos a radiação, com a finalidade de verificar se ocorre a potencialização dos metabólitos secundários nas amostras irradiadas, e se o possível aumento desses compostos é capaz de resultar em uma maior bioatividade dos extratos. Direcionando assim, para a avaliação do efeito farmacológico em diferentes vias envolvidas nos processos inflamatórios e oxidativos. Direcionando para a obtenção de uma alternativa terapêutica e eficaz que venha a acrescentar no tratamento das doenças cotidianas.

## 2.4 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS E FITOCOMPOSTOS ASSOCIADOS A ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

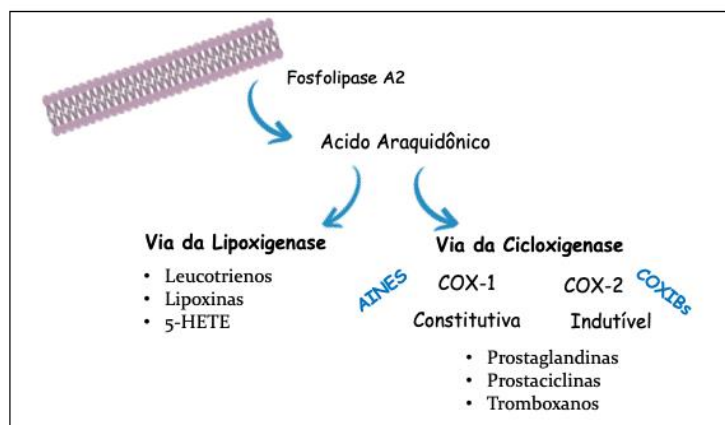
### 2.4.1 Processos inflamatórios

A inflamação é um processo complexo, que constitui uma das primeiras linhas de defesa contra uma série de estímulos que são considerados prejudiciais, tais como bactérias, traumas e irritações (LAVETI et al., 2013). Os processos inflamatórios agudos podem servir para proteger o organismo, por outro lado, processos inflamatórios desregulados ou crônicos são a base de um número de condições patológicas que incluem asma, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, entre muitas outras (PEREIRA et al., 2014).

A cascata do ácido araquidônico é uma rota conhecida por seu papel fundamental na expressão dos processos inflamatórios, há duas isoenzimas capazes de converter o AA em endoperóxido de prostaglandina. A COX-1 constitutiva na maioria das células e a COX-2 indutível, sua expressão se dá de acordo com o estímulo, essas são responsáveis pela produção de prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanos (KATZUNG, MASTERS e TREVOR, 2014). A 5-,12- e 15-lipoxigenase (LOX), assim como as COX, também são formadas pelo ácido araquidônico, que é liberado da membrana celular através da ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, conforme a figura 3.

Como resultado da reação, ocorre a produção dos ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HPETEs), convertidos a derivados hidroxi (HPETEs) e leucotrienos. A LOX atua na formação de hidroperóxidos a partir de ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido linoleico, e são expressos em células tumorais, sistema imune e células envolvidas em processos inflamatórios, onde estão envolvidos na síntese de leucotrienos (Mashima e Okuyama, 2015). Os leucotrienos produzidos pela 5-LOX são os de maior interesse para a pesquisa, uma vez que é associada a doenças cardiovasculares, choque anafilático e asma.

**Figura 3.** Cascata do ácido araquidônico na síntese de eicosanóides



Fonte: A autora

Vários mediadores são conhecidos por modular o processo inflamatório, entre esses encontram-se o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) pertencente a uma classe de fatores de transcrição gênica, responsável por regular a expressão de múltiplos genes envolvidos na resposta inflamatória. Os genes alvo que codificam proteínas incluem citocinas pró-

inflamatórias que são: interleucinas (ILs) 1, 2, 6, 7, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Kundu e Surh 2012). As citocinas estão diretamente ligadas à inflamação, pois são responsáveis pela modulação da resposta inflamatória. Em um distúrbio metabólico, há uma formação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias que podem levar a danos aos órgãos vitais (WOJDASIEWCZ, PONIATOWSKI e SZUKIEWICZ, 2014).

O óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) é um radical livre altamente reativo envolvido em diversos processos fisiológicos e em condições anormais possui caráter pró-inflamatório. Desempenha um papel importante na patogênese da inflamação atuando como agente vasodilatador as citocinas pró-inflamatórias levam à expressão da  $\text{NO}$  indutível em monócitos / macrófagos, granulócitos neutrófilos e muitas outras células (AHMAD et al., 2018). A mieloperoxidase (MPO) é outro importante biomarcador envolvido no estresse oxidativo e inflamação. É uma enzima presente em macrófagos e grânulos azurofílicos de neutrófilos polimorfonucleares, no processo inflamatório é liberada no líquido extracelular provocando lesão tecidual e a patogênese de várias doenças como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (Khan et al., 2018; Loria et al., 2008).

Entre os tratamentos convencionais que visam a diminuição dos processos inflamatórios estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que possuem ação analgésica, antitérmica, antitrombótica e anti-inflamatória. Os AINES inibem a síntese de prostaglandinas que são substâncias endógenas intermediárias do processo inflamatório, mediante a inativação das COX-1 e COX-2 (RIBEIRO et al., 2018). A primeira, presente em sítios gástricos e renais, seria responsável pela síntese de prostaglandinas responsáveis pela proteção tecidual, a segunda surge nos locais de inflamação.

A inibição de COX-1 por AINES convencionais acarretam alguns dos efeitos adversos característicos dessa classe medicamentosa (gastropatia e nefropatia), já fármacos conhecidos inibidores seletivos da COX-2 (Coxibes) apresentam eficácia frente a processos inflamatórios e uma significativa redução de efeitos gastrointestinais, porém muitos fármacos dessa classe foram retirados do mercado por apresentarem cardiopatias em pacientes (WANNAMACHER e BREDEMEIER, 2004). Diante da necessidade de novos agentes anti-inflamatórios que promovam a diminuição de efeitos adversos, pesquisas com o potencial anti-inflamatório de extratos de plantas medicinais vem ganhando destaque.

### 2.4.2 Potencial anti-inflamatório dos compostos fenólicos

A atividade anti-inflamatória dos compostos fenólicos tem sido investigada, são numerosos os estudos que demonstram que os flavonoides podem prevenir e atenuar a resposta inflamatória. Quanto aos mecanismos de ação esses podem ser explicados por vários meios, através da inibição das isoformas da óxido nítrico sintase reduzida, cicloxigenases, lipoxigenase, redução da permeabilidade vascular, atividade antioxidante, inibição do óxido nítrico, entre outros (KUMAR e PANDEY, 2013).

Os flavonoides com potencial anti-inflamatório como a rutina e o canferol apresentam algumas vantagens sobre os AINES, principalmente relacionadas aos efeitos adversos e a segurança desses compostos. Estudos demonstram que esses fitocompostos são capazes de proteger a mucosa gástrica, sem apresentar o efeito ulcerogênico dos AINES usuais (DI CARLO et al., 1999; RIBEIRO, 2018).

A quercetina é um metabólito secundário, membro da classe dos flavonóides, amplamente distribuído entre uma variedade de plantas, apresenta-se livre ou como glicosídeo, como a quercetina-3-glicosídeo e o rutinosídeo. Estes compostos são conhecidos pelo seu potencial anti-inflamatório e outras propriedades terapêuticas (RIBEIRO et al., 2018). A atividade anti-inflamatória dos flavonóides ocorre geralmente devido à inibição do metabolismo do ácido araquidônico, que interfere na síntese de enzimas como COX e LOX (TUNGMUNNITHUM, THONGBOONYOU e PHOLBOON, 2018). Ribeiro e colaboradores (2014) mostraram que a quercetina e seus glicosídeos são eficazes na supressão do processo inflamatório, inibindo a LOX e inibindo a formação do leucotrieno B4 (LTB4), importante mediador envolvido na inflamação, atenuando o processo inflamatório.

Vários estudos relataram que o canferol e seus derivados possuem propriedades anti-inflamatórias (DEVI et al., 2015), com potentes efeitos inibitórios na expressão de enzimas como COX-1, COX-2 e LOX em ensaios sem células e células, também é relatado que eles podem prevenir a produção de óxido nítrico induzida por LPS em células RAW 264.7, suprimindo assim uma resposta inflamatória (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011; WANG et al., 2018).

O ácido protocatequico (PCA) e ácido p-cumárico são ácidos fenólicos, sua estrutura é semelhante à dos ácidos gálico, cafeico e siríngico, conhecidos por seu importante potencial antioxidante (LENDE et al., 2011). Segundo Hsu, Lu e Jao (2009) o PCA apresenta ação inibitória contra a COX-2, óxido sintase (*in vitro*), na expressão de mieloperoxidase e nos níveis de nitrito e nitrato sob dano hepático induzido, o que demonstra que este composto

apresenta inibição potencial de mediadores pró-inflamatórios e enzimas como a LOX (LIU et al., 2002). Estudos relatam que o ácido p-cumárico é um potencial inibidor de COX-2 e LOX e inibe a produção de citocinas inflamatórias induzidas pelo LPS pelo bloqueio das vias de sinalização, como o fator nuclear kappa B (NF-kB) (OOH et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

Em estudo realizado com 20 plantas do gênero *Citrus* a atividade inibitória da produção óxido nítrico foi avaliada, os flavonoides naringina, hesperidina, rutina e naringenina foram identificados em todas as amostras analisadas. Os resultados obtidos nesse ensaio apontaram uma inibição dose dependente de óxido nítrico induzido por LPS em células RAW 264,7 (CHOI et al., 2007). A administração oral de luteolina é capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  em vários modelos inflamatórios e alérgicos (UEDA et al., 2002). Flavonoides como miricetina e apigenina apresentaram atividade inibitória de TNF- $\alpha$  induzido por LPS em ensaios *in vitro* e *in vivo* (UEDA et al., 2004).

É fundamental a realização de estudos que elucidem os mecanismos anti-inflamatórios e a segurança no uso das plantas medicinais, já que compostos obtidos de espécies vegetais são uma fonte viável na identificação de uma alternativa terapêutica frente a distúrbios inflamatórios.

## 2.5 A TOXICIDADE PROVENIENTE DAS ESPÉCIES OXIDANTES E DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 2.5.1 Espécies oxidantes e estresse oxidativo

A utilização do oxigênio por parte dos organismos representa um paradoxo biológico, organismos aeróbios necessitam do oxigênio para sobreviver, porém o oxigênio utilizado pode ser muito tóxico. A vida é um processo dinâmico, sendo a sobrevivência dos organismos consequência de um conjunto de processos e funções interagindo harmoniosamente. Um desequilíbrio durante esse conjunto de funções, pode resultar em uma auto regulação ou ficar indelevelmente marcado, tal disfunção pode gerar moléculas que danificam o organismo, essas denominadas de espécies reativas de oxigênio ou agentes oxidantes (MARRONI et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular, inclui as espécies radicalares e as não radicalares que mesmo não possuindo elétrons desemparelhados,

são reativas devido a sua instabilidade (HALLIWELL, 2006). Os radicais livres (RL) são definidos como qualquer espécie química, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, geralmente o mais externo. O elétron desemparelhado eleva a reatividade dos RLs, das EROs e das ERNs, a fim de estabilizar-se o radical captura elétrons de outras estruturas formando complexos que podem causar danos ao organismo (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Segundo Marroni et al., (2012) quando ocorre uma maior produção de radicais livres, ou uma diminuição nas defesas antioxidantes pode ocorrer uma situação de desequilíbrio, desencadeando um processo denominado de estresse oxidativo (EO). O EO caracteriza-se como um estado da célula na qual se encontra alterada a homeostasia da oxirredução intracelular, levando a um aumento de EROs e ERNs, por uma deficiência nos sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos ou por ambos. O desequilíbrio redox celular pode causar danos a todos os tipos de biomoléculas, estrutura de proteínas, processos enzimáticos das membranas lipídicas e provocar lesões no DNA. O processo está relacionado a doenças degenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (MENSOR, 2001; BIRBEN, 2012).

Os efeitos tóxicos das EROS e as alterações na fisiologia hepática podem ser verificadas através do doseamento de enzimas que podem auxiliar na avaliação da função hepática, como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT),  $\gamma$ - glutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA). Outros parâmetros importantes a serem analisados são: o conteúdo sérico de albumina, bilirrubina, proteínas totais e colesterol (WILNER; REUBEN, 2005). As enzimas hepáticas aparecem no soro quando ocorre dano à membrana plasmática causado pela peroxidação lipídica. A elevação da AST e da ALT séricas indica lesão e necrose hepatocelular (ADAMS; ÂNGULO, 2005). Níveis acentuadamente elevados dessas enzimas (>1.000 U/L) ocorrem tipicamente nas lesões hepatocelulares agudas e crônicas, doenças infiltrativas e obstrução biliar. A FA é uma enzima encontrada em vários tecidos (ossos, intestino, rim, leucócitos, fígado e placenta). O nível sérico de FA está frequentemente elevado na obstrução, nas lesões expansivas, cirrose biliar primária e colestase fármaco-induzida (GINÈS et al., 2004).

### **2.5.2 Lipoperoxidação**

As EROs podem prejudicar a função celular, devido a oxidação de ácidos graxos presentes na membrana plasmática a qual é basicamente formada por uma dupla camada

lipídica (ESTERBAUER, 1993). A lipoperoxidação (LPO) inicia quando um radical livre abstrai um elétron da molécula que estiver mais próxima, normalmente de um ácido graxo da bicamada lipídica e forma um radical, um lipídio hidroperóxido, este se torna um radical livre, instável e reativo, que para se estabilizar vai capturar outro elétron e assim desencadeando uma reação em cadeia. Como consequência deste processo, há alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Assim, há liberação do conteúdo de organelas, perda da seletividade da troca iônica, e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA); Estes eventos podem resultar em morte celular.

Dentre os produtos gerados pela peroxidação lipídica encontra-se o malonaldeído (MDA), composto que pode atacar resíduos de aminoácidos (induzindo perda de função por parte de proteínas) ou bases nitrogenadas (tendo assim propriedades mutagênicas), que pode ser utilizado no monitoramento dos níveis de lipoperoxidação.

## 2.6 PLANTAS MEDICINAIS E SEU POTENCIAL TÓXICO

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Comparada à propriedade dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer desprezível. Isto, entretanto, não é verdade (SIMÕES et al., 2010).

Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, as possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outros medicamentos) ocorrem comumente, o que torna a toxicidade de plantas medicinais um problema sério de saúde pública. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização em feiras livres pelos órgãos oficiais, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA et al., 2005).

O *Ginkgo biloba* é um dos fitoterápicos mais prescritos por clínicos na Europa. E estava presente em 5,4 milhões de prescrições médicas realizadas apenas na Alemanha (BLUMENTAHL, 1998). Administrado em doses elevadas ou em tratamentos crônicos, o ginkgo apresenta efeitos colaterais como náusea e vômito. Outros efeitos colaterais reportados foram salivagem aumentada, perda de apetite, enxaqueca, alergias cutâneas e insônia. Já foram notificados casos de hemorragia cerebral e subaracnóidea em pacientes que associavam varfarina e aspirina ao tratamento com ginkgo. Estes eventos possivelmente ocorrem porque a planta inibe o fator de agregação plaquetário (DUNNE, 2009).

Em um levantamento bibliográfico realizado por Daniyal e Akram (2015) foi evidenciado que a utilização de algumas plantas como *Polygonum hydropiper* conhecida popularmente como Erva-de-bicho utilizada para tratar problemas gastrointestinais, causa a infertilidade por possuir um efeito anti-ovulatório. *Plumbago zeylanica* conhecida como Erva-de-chumbo do Ceilão utilizada como antidiabético natural, além de ser conhecido por suas propriedades antioxidantes tem a capacidade de diminuir a produção de espermatozoides devido a alguns dos compostos presentes na sua constituição fitoquímica como: ácido vanílico, beta-sitosterol e 4-hidróxibenzaldeído.

*Polygonatum multiflorum* é uma das espécies de plantas mais populares na medicina tradicional chinesa e tem sido amplamente utilizado na China por muitos séculos para tratar várias doenças comumente associadas ao envelhecimento, pesquisas modernas demonstraram que *P. multiflorum* poderia ter um papel importante no tratamento do Alzheimer, doença de Parkinson, hiperlipidemia, inflamação e câncer (LIN et al., 2015). No entanto, estudos recentes afirmam que o uso contínuo da referida planta medicinal pode gerar hepato e nefrotoxicidade e que seu uso associado a varfarina pode gerar uma possível supressão da medula óssea (MIN et al., 2008; LIN et al., 2015).

No ano de 2006 foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813, apresenta em suas diretrizes o incentivo ao desenvolvimento e à pesquisa no que se refere ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com eficácia, segurança e qualidade à população, dando prioridade à biodiversidade do país (BRASIL, 2006; CARVALHO et al., 2007). Devido a essa implementação e ao uso indiscriminado de tinturas, infusões e extratos vegetais pela população tornam-se necessários estudos toxicológicos pré-clínicos para oferecer maiores esclarecimentos a respeito das plantas medicinais utilizadas amplamente em meio popular (CASTRO, 2006).

### **2.5.1 Modelos experimentais toxicológicos em animais: Um panorama**

Os estudos toxicológicos possuem como função identificar possíveis efeitos adversos provenientes da exposição humana a determinada substância química, desse modo experimentos que investiguem a ação tóxica de tais substâncias vêm sendo requeridos nos processos investigativos, entre os modelos amplamente utilizados para esse fim estão os modelos animais (MEYER, 2003; PARASURAMAN, 2011). O uso de animais na pesquisa



ao longo dos anos vêm sendo foco de diversas discussões, principalmente no que tange o caráter ético. Em 1929 foi implementada a DL<sub>50</sub> (dose letal mediana), um parâmetro que se fundamenta na dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50% de uma população em teste, as cobaias eram expostas a doses crescentes de determinada substância por um determinado período de tempo até se determinar a dose que mataria 50% da população testada (CAZARIN et al., 2004).

Nesse contexto, no ano de 1954 foi criado um programa internacionalmente reconhecido denominado de 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), que tem como objetivo reduzir o número de animais utilizados na pesquisa, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (SCHECHTMAN, 2002; RUSSEL e BURCH, 1992; BALLS, 1994; FLECKNELL, 1994). A partir do programa 3Rs a preocupação com o bem estar animal se manteve constante no meio experimental, no ano de 1981, em reconhecimento das vantagens dos métodos de teste acordados internacionalmente, os países membros e parceiros da OCDE (*Organization for Economic Co-operation and Development*) desenvolveram as Diretrizes da OCDE para o Teste de Produtos Químicos, a fim de, entre outros objetivos, minimizar o número de animais utilizados em experimentos.

No ano de 1983 o FDA (*The Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos anunciou formalmente que não iria mais requerer o teste clássico de toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>), mas somente em 2002, a OECD anuncia oficialmente os planos de extinguir o teste de DL<sub>50</sub> de seus protocolos, em favor de métodos alternativos *in vitro* existentes como testes de genotoxicidade, micronúcleos (OECD 487), além de testes *in vivo* como toxicidade aguda (OECD 423) e sub-aguda (OECD 407) que tem como estratégia para reduzir o uso de animais. No que tange a toxicidade aguda os resultados são interpretados conforme a capacidade de determinada substância de causar a mortalidade dos animais envolvidos no experimento, se os mesmos sobreviverem durante o ensaio a substância testada deve ser incluída na categoria-5, com DL<sub>50</sub> entre 2000-5000 mg/Kg. Com o passar dos anos os ensaios de toxicidade foram marcados pela preocupação com o bem-estar animal, tais experimentos são de grande valia na pesquisa associada ao uso de plantas medicinais, para promover o consumo consciente e seguro dessas espécies vegetais.

Como a maior parte da flora é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico. Atualmente, a fitoterapia é um desafio para os cientistas e para as indústrias

farmacêuticas na descoberta de novos medicamentos fitoterápicos que possuam eficácia, segurança e controle de qualidade essencial, bem como conhecer os efeitos colaterais, toxicidade e ação farmacológica específicas de cada planta medicinal para garantir a saúde da população. Abraçando este desafio, busca-se neste trabalho pesquisar e comprovar cientificamente os efeitos biológicos do extrato bruto de *C. ambrosioides* L., bem avaliar uma possível toxicidade da espécie a fim de promover uma maior compreensão de seus efeitos e segurança em seu uso pela população.

## **OBJETIVOS**

---



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho se fundamenta em realizar a caracterização química de extratos irradiados e não irradiados de *C. ambrosioides* L., bem como elucidar os mecanismos de ação envolvidos na possível atividade anti-inflamatória da espécie, determinar sua segurança e bioatividade através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extratos de *C. ambrosioides* irradiados e não irradiados:

- Identificar, quantificar e comparar o perfil cromatográfico;
- Avaliar o potencial inibitório frente a LOX;
- Determinar a atividade de captura do óxido nítrico;
- Determinar concentrações seguras das amostras, que não afetem a viabilidade de células RAW 264,7;
- Determinar o potencial de redução do óxido nítrico celular, induzido pelo LPS;
- Comparar se a possível alteração na composição de extratos submetidos a radiação é capaz de gerar um efeito na bioatividade da planta;

Extrato liofilizado de *C. ambrosioides*:

- Avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas L. em ratos *Wistar*;
- Analisar possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos ocasionadas pela administração do extrato da planta;
- Determinar a lipoperoxidação em órgãos como fígado e rim em ratos *Wistar*;
- Determinar a capacidade de redução do edema de orelha ocasionado pelo óleo de cróton em camundongos *Swiss*.
- Mensurar a possível redução da atividade da MPO pelo extrato da planta;
- Comparar o efeito anti-inflamatório de *C. ambrosioides* L. com o extrato de *B. serrata*.



**CAPÍTULO 1:** Análise química comparativa e potencial anti-inflamatório *in vitro* de extratos de *C. ambrosioides* L. submetidos a radiação ionizante

---





## CAPÍTULO 1: Análise química comparativa e potencial anti-inflamatório *in vitro* de extratos de *C. ambrosioides* L. submetidos a radiação ionizante

### 1.1 APRESENTAÇÃO

A utilização popular e a falta de monografias que tenham como objeto de estudo a espécie *C. ambrosioides* L. e sua inserção no RENISUS, evidenciam a necessidade da realização de ensaios pré-clínicos com a planta. Alguns autores realizaram a caracterização química de extratos e do óleo essencial da referida espécie vegetal, onde foram encontrados importantes compostos fenólicos, tais como: derivados do canferol, quercetina e seus glicosídeos, rutina, entre outros, os quais são conhecidos por sua atividade farmacológica.

Diante da ideia do enriquecimento fitoquímico, vem a as seguintes questões: Extratos de *C. ambrosioides* submetidos à radiação gama, apresentariam uma maior concentração ou transformação em seus fitocompostos? uma possível alteração na composição química nos extratos da espécie seria capaz de interferir na sua bioatividade?

Com base no exposto, o objetivo deste capítulo é apresentar a comparação fitoquímica de extratos de *C. ambrosioides* irradiados e não irradiados, e verificar se possíveis alterações na sua composição química são capazes de promover uma diferença em seu potencial anti-inflamatório, tendo em vista que os processos inflamatórios são a causa de muitas doenças. Para isso, foram realizados ensaios através de modelos *in vitro*. Os resultados encontram-se na forma de um manuscrito desenvolvido para submissão na revista Food Chemistry.



**MANUSCRITO 1:** Influence of gamma radiation on the chemical composition of *Chenopodium ambrosioides* L. and its anti-inflammatory potential

---



**Influence of gamma radiation on the chemical composition of *Chenopodium ambrosioides*  
L. and its anti-inflammatory potential**

Roberta S. Jesus<sup>a</sup>, Rui G. Gonçalves<sup>b</sup>, David M. Pereira <sup>b</sup>, Patrícia Valentão <sup>b</sup>, Tadeu Baumhardt<sup>c</sup>, Paula B. Andrade<sup>b,\*</sup>, Liliane F. Bauermann<sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup>Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>REQUIMTE/LAQV, Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, n.º.228, 4050-313, Porto, Portugal.

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

**\* Corresponding author**

pandrade@ff.up.pt (Paula B. Andrade); lgfbauermann@gmail.com (Liliane F. Bauermann)

## Abstract

Gamma radiation has been the focus of studies due to its varied use, especially in medicine and the food industry. However, little is known regarding the bioactivity of irradiated plant extracts. *Chenopodium ambrosioides* L. is used in folk medicine for the treatment of digestive issues and diseases associated with inflammatory processes, being consumed as an infusion. The present research explores the chromatographic profile by HPLC-DAD and the anti-inflammatory activity of irradiated and non-irradiated extracts of this species, in order to compare their bioactivity and to verify possible changes in the chemical profile caused by gamma radiation. All samples showed the same qualitative chromatographic profile, but quantitative differences between compounds identified in the extracts were found. For example, the irradiated plant extract presented an increase of kaempferol derivatives and quercetin derivatives about 20 times than other extracts. All the samples tested were effective at inhibiting lipoxygenase at 0.400 – 0.488 mg/mL. Regarding nitric oxide radical, the non-irradiated extract (NIPE) presented the best scavenging potential (IC<sub>50</sub> value of 0.431 mg/mL). Samples were also evaluated for their toxicity and anti-inflammatory potential in RAW 264.7 macrophages, presenting a safe concentration range up to 0.250 mg/mL and NIPE was the most effective one in the reduction of NO in cellular assay (IC<sub>50</sub> 0.201 ± 0.029 mg/mL). According to the results, it can be stated that gamma radiation was able to alter the phytochemical composition of *C. ambrosioides*. However, the biological activity was not changed significantly.

*Keywords: Gamma radiation; Chenopodium ambrosioides; Erva-de-Santa-Maria; Lipoxygenase; Nitric Oxide; RAW 264.7 macrophages.*

### *Highlights:*

- *Gamma radiation promotes alteration in the chemical composition of C. ambrosioides.*
- *Non-irradiated extract of C. ambrosioides reduced the inflammation caused by LPS in cell assay.*
- *Extracts of C. ambrosioides are able to inhibit LOX.*

## 1. Introduction

Inflammation is a complex process, generally characterized by the increase of free radicals and the decrease of antioxidant defenses. It is one of the first lines of defense against a series of stimuli that are considered harmful, such as bacteria, traumas and irritations (Joshi et al., 2016; Zipp e Aktas, 2006). Acute inflammatory processes can serve to protect the body; however, when deregulated or chronic, they are the basis of a number of pathological conditions, including asthma, rheumatoid arthritis, and cardiovascular diseases (Pereira et al., 2014). Among the many inflammatory mediators known, nitric oxide (NO) is a signaling molecule that plays a fundamental role in the pathogenesis of inflammation acting as vasodilator. Pro-inflammatory cytokines lead to expression of the inducible NO synthase in monocyte/ macrophages, neutrophil granulocytes and many other cells. Inflammatory processes are mainly characterized by the high production of pro-inflammatory eicosanoids derived from arachidonic acid (AA) through the enzymatic activity of lipoxygenases (LOX) and cyclooxygenases (COX) (Joshi et al., 2016; Sharma et al., 2007).

With the goal of treating several distinct diseases, many of which of inflammatory-basis, medicinal plants have been largely employed worldwide, mainly due to the easy access, but also as a result of the empirical knowledge passed through generations. In addition, the World Health Organization (WHO) advocates, at the global level, the development of research on medicinal plants for therapeutic purposes (WHO, 1999). Besides being promising for the identification of new pharmacological substances that serve as raw material for pharmaceutical industries, medicinal plants can also be interesting to be included in nutraceuticals, as food additives and even as ingredients in the preparation of functional foods (Barros et al., 2013).

The leaves and branches of *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), known in Brazil as "Erva-de-Santa-Maria", are usually consumed by the population in the form of infusion, due to the attributed antirheumatic, antipyretic, antimicrobial, anti-inflammatory, vermifuge, and antiulcer properties, as well as for the healing of various diseases (Barros et al., 2013; Costa e Tavares, 2006). Studies have demonstrated its effective anti-inflammatory and analgesic capacity in osteoarthritis *in vivo*, reducing synovial inflammation (Calado et al., 2015). *C. ambrosioides* has also shown the capacity to inhibit important inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E<sub>2</sub> and nitric oxide *in vivo* (Grassi et al., 2013).

Phytochemicals, such as polyphenols, are able to neutralize free radicals, and reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) generated by cellular metabolism, which, at high concentrations, damage cells and tissues (Li et al., 2015). The antioxidant activity is linked to the ability to protect a biological system against potentially harmful reactions that cause excessive oxidation, which is related to cardiovascular diseases, hypertension, cancer, and aging (Adegbola et al., 2017). Factors such as climate, soil type and harvesting time may interfere with the production of these bioactive compounds that arise from the secondary metabolism of plants, whose functions are adaptation to the environment, attraction of pollinators, protection against UV radiation, among others (Santos et al., 2018). In order to potentiate the concentration of bioactive metabolites responsible for the pharmacological action of medicinal plants, recent studies show an innovative alternative for this purpose: ionizing radiation (Vardhan e Shukla, 2017). Gamma radiation is considered a rapid and novel method to increase the qualitative and quantitative traits of many plants that has been widely used in biology and medicine. Studies have shown that relatively low doses of ionizing radiation on microorganisms and photosynthetic plants potentiate cell growth, cell proliferation, germination rate, enzyme activity and resistance to stress (Chakravarty & Sen, 2001; Taghipour, 2004).

The present study aims to evaluate the anti-inflammatory potential of irradiated and non-irradiated extracts of *C. ambrosioides*, in order to demonstrate if the radiation influences the chemical composition and whether the possible changes are associated to their bioactivity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Standards and reagents

Linoleic acid ( $\geq 99.0\%$ ), (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), trypan blue, soybean lipoxygenase (LOX) from *Glycine max* (L.) Merr. (Type V-S; EC 1.13.11.12). Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was treated in a Milli-Q (Millipore; Bedford, MA, USA) water purification system. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-GlutaMAX™-I, Hanks' balanced salt solution (HBSS), heat inactivated fetal bovine serum (FBS), and Pen Strep solution (Penicillin 5000 units/mL and Streptomycin 5000 $\mu$ g/mL) were obtained from Gibco® (Life Technologies, Invitrogen™; Grand Island, NY, USA). The murine macrophage-like cell line RAW 264.7 was purchased from the American Type Culture Collection (LGC Standards S.L.U., Spain). Reference



compounds, namely protocatechuic acid, quercetin-3-*O*-rutinoside, quercetin-3-*O*-glucoside and kaempferol-3-*O*-rutinoside, were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

## 2.2 Plant collection

*C. ambrosioides* L. branches were collected in the city of Uruguaiana, state of Rio Grande do Sul, Brazil (altitude 57 m, 29 ° latitude, 45'20, 12" S, longitude 57 ° 4'0.28), in March of 2017. The exsiccate was archived as specimen in the herbarium of the Department of Biology at the Federal University of Santa Maria (Brazil), under the register number of SMDB 137015, for future reference.

## 2.3 Extraction and irradiation

Part of the collected fresh branches of *C. ambrosioides* was irradiated in the radiotherapy sector of the University Hospital of Santa Maria (HUSM) of the Federal University of Santa Maria, using the radiator Theratron 780C, which radiates <sup>60</sup>Co gamma rays at a dose of 1kGy. After irradiation the vegetal material was dried in an oven, at 40 °C, and then milled. The dried vegetable powder (100 g) was placed in contact with 1000 mL of 70% EtOH and subjected to daily agitation for seven days (Mello et al., 2017).

The obtained macerate was concentrated in a rotary evaporator. The aqueous fraction was subsequently lyophilized, thus obtaining the irradiated plant extract (**IPE**). The same extraction process was performed with the non-irradiated material, to obtain the non-irradiated plant extract (**NIPE**). Part of this later extract was irradiated afterwards (irradiated extract, **IE**) to detect possible alterations in the extract composition.

This study was approved by the University Hospital of Santa Maria-Brazil and is registered under the protocol number: 057/2017.

## 2.4 Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds by HPLC-DAD

For the identification and quantification of the phenolic compounds the analytical conditions were adapted from Barros et al. (2013). **IPE**, **IE**, **NIPE** and standard solutions (20 µL) were injected on a HPLC-DAD unit (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France) after filtration (0.45 µm) and eluted on a Luna C<sub>18</sub> (5 µM, 250 × 4.6 mm, Phenomenex, Macclesfield, UK) column, at 25 °C. Detection was achieved with an Agilent 1100 series DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), and chromatograms were recorded at 280 and 350 nm (Clarity Software version 5.04.158, DataApex Ltd, Prague, Czech Republic). The mobile phase was composed by 0.1% formic acid in water (A) and acetonitrile (B). The elution gradient established was isocratic 85% B for 10 min, 80% B over 5 min, 80-75% B

over 10 min, 75-70% B over 7 min, isocratic 70% B for 3 min, 70-65% for 5 min, and 65-50% B for 10 min, followed by re-equilibration of the column, and was developed at a flow rate of 0.5 mL/min. The phenolic compounds present in **IPE**, **IE**, **NIPE** were identified according to their UV spectra and retention time, as well as by comparison with the profile obtained by Barros *et al.*, (2013). Compounds were quantified by interpolation with external standard curves (Table 1) as follows: protocatechuic acid as itself, at 280 nm, quercetin derivatives (**2**, **6** and **8**) were quantified as quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol derivatives (**3-5**, **7**, **11-13**) as kaempferol-3-*O*-rutinoside, at 350 nm, and *p*-coumaroyl acid derivatives (**9** and **10**) as *p*-coumaric acid, at 320 nm.

## 2.5. Method validation

Regression equation, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) data for the quantification of the identified compounds are presented in Table 1.

Repeatability (intraday assay) was assessed by triplicate analysis of three different concentrations of standard solutions in the same day and expressed as relative standard deviation (RSD). The intermediate precision (interday assay) was evaluated by analyzing the middle concentration of the curve three times a day, on three different days; RSD of the peak area was calculated as measure of inter-day precision. Recoveries were determined by adding to the sample low, medium, and high amounts of compounds found in **NIPE**.

**Table 1.** Regression equation, LOD and LOQ data for the quantification of the identified phenolic compounds. PCA: Protocatechuic acid; Q-3-*O*-gluc.: Quercetin-3-*O*-glucoside; K-3-*O*-rut.: Kaempferol-3 *O*-rutinoside.

Compounds	Linear equation	$r^2$	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Intraday precision (CV%)	Interday precision (CV%)
PCA	$y = 41297x - 1074.5$	0.99	$6.48 \times 10^{-4}$	$1.96 \times 10^{-3}$	4.11	2.54
Q-3- <i>O</i> -gluc.	$y = 41765x - 1281.6$	0.99	$3.41 \times 10^{-4}$	$1.34 \times 10^{-3}$	2.93	4.34
K-3- <i>O</i> -rut.	$y = 64517x - 491.54$	0.99	$4.88 \times 10^{-5}$	$1.47 \times 10^{-4}$	7.69	3.18

## 2.6 Cell assays

### 2.6.1 Cell viability

RAW 264.7 cells were plated in 96-well plates (25,000 cells/well). After 24 h, different concentrations of **IE**, **IPE** and **NIPE** (0.0625-1 mg/mL) were added and the plates

were incubated for other 24 h at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Thereafter, MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/mL and incubated for 2 h (Pereira et al., 2017). The formazan crystals formed were extracted with DMSO: isopropanol (1:3) mixture and spectrophotometrically read in a multi-plate reader (Multiskan ASCENT, Massachusetts, USA). Results are expressed as percentage of the respective control and correspond to the mean ± standard error of the mean (SEM) of, at least, five independent experiments performed in triplicate.

### 2.6.2 Determination of NO Levels

RAW 264.7 cells were cultured in 96-well plates (35,000 cells/well) for 24 h and then pre-treated with different concentrations of **IE**, **IPE**, and **NIPE** during 2 h, according to a methodology described by Silva et al. (2017). Afterwards, LPS was added (final concentration 1 µg/mL) and the plates were incubated for 22 h at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The nitrite resulting from the conversion of NO in the culture medium was quantified by mixing 75 µL of culture media with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and incubated for 10 min in the dark, after which absorbance was read at 540 nm in a microplate reader (Multiskan ASCENT, Haverhill, MA, USA). The results correspond to the mean ± SEM of five independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of NO in cells exposed to LPS (positive control for NO production).

## 2.7 Cell free assays

### 2.7.1 NO scavenging activity

The NO scavenging potential of extracts of *C. ambrosioides* was determined using Griess reagent, following a methodology described by Lopes et al. (2012). The scavenging potential (%) was calculated according the following equation:

$$(\%) = 100 \times 1 - \frac{[ \text{abs. of sample} - \text{abs. of blank} ]}{\text{abs. of control} - \text{abs. of blank} }$$

The percentage of NO scavenging activity was plotted against the sample concentration to obtain the IC<sub>50</sub> value. Five independent experiments were performed in triplicate.

### 2.7.2 Lipoxygenase inhibition

The inhibition of lipoxygenase was evaluated according to the procedure previously described by Barbosa et al. (2017). The samples were diluted in phosphate buffer (pH 9), 20  $\mu$ L were added to the 96 well plates along with 200  $\mu$ L of 0.1 M phosphate buffer and 20  $\mu$ L of soybean lipoxygenase (100U/20 $\mu$ L). After 5 min of incubation at room temperature, 20  $\mu$ L of linoleic acid (4.18 mM in ethanol) was added and kinetics were followed for 3 min, at 234 nm, in a microplate reader (Multiskan ASCENT, Massachusetts, USA). Three independent experiments were performed in triplicate.

### 2.8 Statistical analysis

Data obtained from, at least, five independent experiments, were analyzed using GraphPad Prism 7 Software, Inc. (San Diego, CA, EUA). The t-Student test was used to compare treated and untreated cells. In all cases, values of  $p < 0,05$  were considered statistically significant.

## 3. Results and Discussion

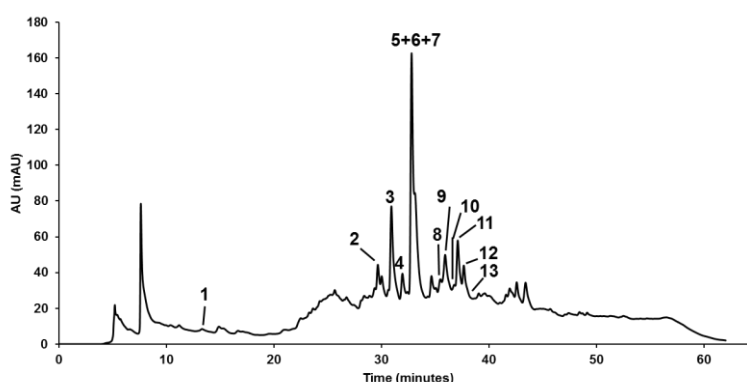
### 3.1 Phenolic profile

The chromatographic profile of the analyzed extracts revealed the presence of protocatechuic acid (**1**), two *p*-coumaric acid derivatives (**9** and **10**) and several quercetin (**2**, **6** and **8**) and kaempferol glycosides (**3-5**, **7**, and **11-13**) (Fig. 1). Besides those also confirmed by the analysis of authentic substance (compounds **1**, **5**, **6**, **7**, **8**, **11**, **12** and **13**), the phenolic compounds present in *C. ambrosioides* extracts were tentatively identified according to that already described by Barros *et al.*, (2013). In fact, the chromatographic profile of the material analyzed herein was similar to that published by those authors.

When comparing the three extracts, there are no differences in the qualitative composition; however, the quantitative analysis allowed noticing differences in the content of several compounds (Table 2). For instance, higher concentrations of kaempferol and quercetin derivatives (**5-7**) were observed in the **IPE** (Table 2), when compared to **NIPE**. This may be associated with the stimuli of enzymatic activity in the plant submitted to gamma radiation (Hussain et al., 2010). On the other hand, the amount of compound **3** was higher in **NIPE** than in **IE** and **IPE**, which points to a possible degradation of the compound caused by irradiation. The degradation of some compounds during irradiation occurs by complex mechanisms, although it can be considered that the breaking of some bonds results in smaller

molecules (Stewart, 2001). Our results are in agreement with a study published by Pereira et al. (2015), where *Ginkgo biloba* samples irradiated at the dose of 1KGy presented a quantitative variation when compared to non-irradiated samples.

We also studied the effect of radiation exposure on the phenolic profile of the lyophilized extract (IE). The concentration of compounds **9+10** and **11** decreased from  $1.30 \pm 0.06$  and  $1.00 \pm 0.01$  to  $0.27 \pm 0.11$  and  $0.04 \pm 0.01$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  lyophilized extract, respectively (Table 2). This reduction is based on the concept that gamma radiation can be able to degrade compounds in *C. ambrosioides* extract, observing that an extract subjected to radiation is not able to respond to external stimuli because there is no enzymatic activity, which may occur the change in chemical composition through the transformation and degradation of compounds (Gumus et al., 2011).



**Figure 1.** HPLC-DAD (350 nm) phenolic profile of *C. ambrosioides* L. non irradiated plant extract (NIPE). Peaks: **1.** Protocatechuic acid; **2.** Quercetin derivative; **3.** Kaempferol derivative; **4.** Kaempferol derivative; **5.** Kaempferol dirhamnoside-*O*-hexoside; **6.** Quercetin-3-*O*-rutinoside; **7.** Kaempferol-*O*-pentosyl-rhamnosyl-hexoside; **8.** Quercetin-3-*O*-glucoside; **9.** *p*-Coumaroyl acid derivative; **10.** *p*-Coumaroyl acid derivative; **11.** Kaempferol-3-*O*-rutinoside; **12.** Kaempferol dirhamnoside-*O*-pentoside; **13.** Kaempferol-*O*-rhamnosyl-pentoside.

**Table 2.** Phenolic compounds content in non-irradiated plant extract (**NIPE**), irradiated extract (**IE**) and irradiated plant extract (**IPE**) of *C. ambrosioides* <sup>1</sup>.

Compound <sup>2</sup>	µg/mg dry extract		
	NIPE	IE	IPE
<b>1</b>	1.80 ± 0.02	1.10 ± 0.02	1.90 ± 0.04
<b>2</b>	1.50 ± 0.01	1.10 ± 0.01	1.00 ± 0.01
<b>3</b>	1.00 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.03 ± 0.01
<b>4</b>	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.00 ± 0.01
<b>5+6+7</b>	0.30 ± 0.03	0.20 ± 0.02	4.60 ± 0.40
<b>8</b>	1.50 ± 0.06	1.10 ± 0.04	0.70 ± 0.49
<b>9+10</b>	1.30 ± 0.06	0.27 ± 0.11	1.30 ± 0.61
<b>11</b>	1.00 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.10 ± 0.56
<b>12+13</b>	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.90 ± 0.44
<b>Σ</b>	8.5	3.98	12.53

<sup>1</sup> Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments, performed in triplicate.

<sup>2</sup> Identity of compounds as in Fig. 1.

The concentration of the metabolites of *C. ambrosioides* in irradiated and non-irradiated extracts is different. IPE presented higher concentration of kaempferol and quercetin derivatives, increasing over 20 fold when compared to NIPE and IE respectively, which suggests the production of secondary metabolites in the plant in response to gamma irradiation as an external aggressor (Vardhan e Shukla, 2017). The irradiated extract presented a lower concentration of phenolic compounds, suggesting that the gamma radiation after preparation of the extract, was able to cause a degradation of compounds (Pereira et al., 2015).

### 3.2 Anti-inflammatory activity

Plants extracts have been the focus of studies due to their pharmacological potential. Many medicinal plants are considered natural anti-inflammatory agents (Yang et al., 2016). As so, assays addressing the anti-inflammatory activity of extracts of *C. ambrosioides* were performed. In order to elucidate possible anti-inflammatory mechanisms, cell-free and cell-based systems were considered.

### 3.2.1 *C. ambrosioides* inhibits lipoxxygenase

The classic route of the inflammatory cascade process begins with the synthesis of arachidonic acid, substrate of important pro-inflammatory enzymes, such as COX and LOX. LOX act in the formation of hydroperoxides from polyunsaturated fatty acids, such as linoleic acid, and are expressed in tumor cells, immune system cells and cells involved in the inflammatory processes, in which they lead to the synthesis of leukotrienes (Mashima e Okuyama, 2015).

Although studies have reported the LOX inhibitory capacity of members of the Amaranthaceae family, including essential oils of the species under study, the inhibitory potential of extracts of *C. ambrosioides* has not yet been documented (Alitonou et al., 2012; Vidal et al., 2014). Despite their different quantitative composition, the three extracts inhibited LOX in a dose-dependent manner (Figure 2-A), showing IC<sub>50</sub> values between 0.400 at 0.488 mg/mL (Table 3).

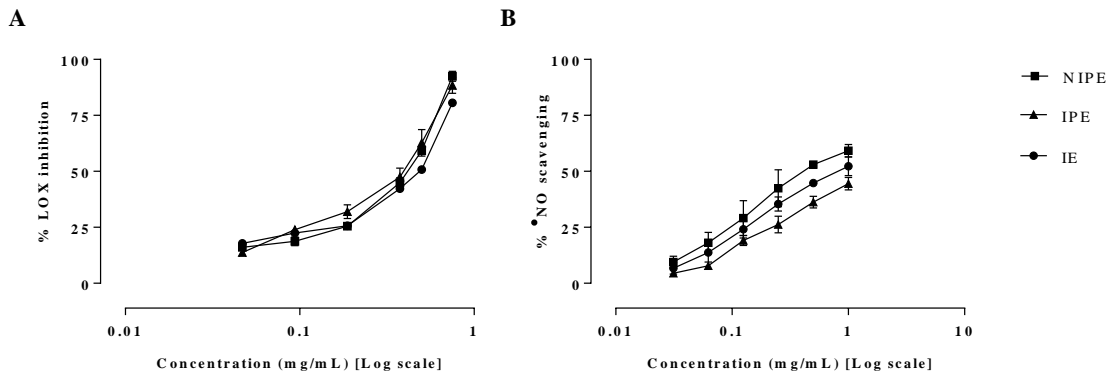
A previous work demonstrated the inhibitory potential of the essential oil of *C. ambrosioides* on LOX, inhibition values ranging between 13 and 23% (Alitonou et al., 2012). Other authors reported the inhibitory potential of LOX by the Amaranthaceae family, showing an inhibition of 80% of the enzyme at 1 mg/mL of the dichloromethane fraction of *Pandiaka angustifolia* (Thiombiano et al., 2014). Our results show a greater inhibition of LOX when compared to those found in the literature, which demonstrates a greater effectiveness of the lyophilized extract when compared to the essential oil of the species.

### 3.2.2 •NO scavenging

•NO has been the subject of research as to its synthesis and its mechanism of action, acting in pathological and physiological processes in different stages of diseases, such as cardiovascular, renal, and rheumatological diseases (Ahmad et al., 2018). It plays important roles in human physiology, being both a vasodilator and neurotransmitter. However, abnormal physiological conditions capable of generating an overproduction of •NO results in a pro-inflammatory behavior of the molecule (Sharma et al., 2007).

Firstly, the •NO scavenging was evaluated in cell-free system. In this assay, **NIPE** presented higher activity when compared with **IPE** and **IE** (Figure 2-B and Table 3). The potential of the genus *Chenopodium* to scavenge •NO was checked before by other authors in a cell-free model: the ethanol extract of *Chenopodium album* also displayed a dose-dependent

activity, the most effective concentration (100  $\mu\text{g/mL}$ ) scavenging approximately 36% of  $\bullet\text{NO}$  (Baldi e Choudhary, 2013).

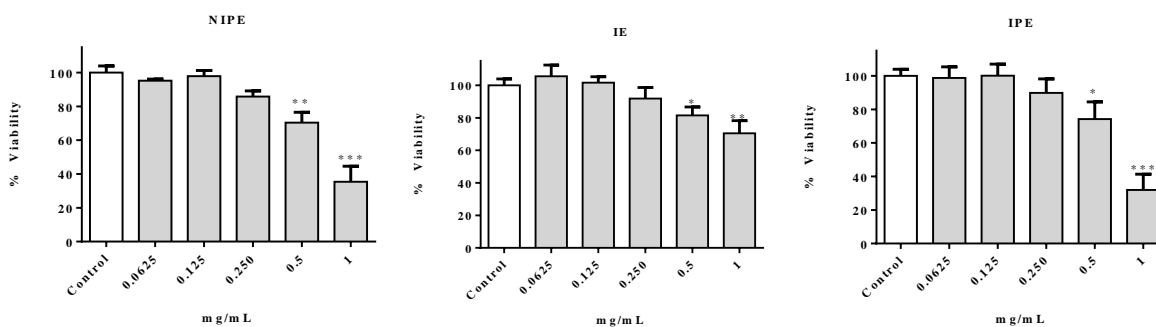


**Figure 2.** Lipoxygenase (LOX) inhibition (A) and nitric oxide radical ( $\bullet\text{NO}$ ) scavenging activity (B) of extracts of *C. ambrosioides* in cell-free assays. Results represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate.

### 3.2.3 Effect in LPS-stimulated macrophages

#### 3.2.3.1 Effect on cell viability

To identify a range of non-cytotoxic concentrations of *C. ambrosioides* extracts their effect on the mitochondrial activity of the macrophage cell line RAW 264.7 was assessed by the MTT reduction assay.



**Figure 3.** Viability of RAW 264.7 macrophages treated with irradiated and non-irradiated extracts of *C. ambrosioides* (NIFE, IPE, IE) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

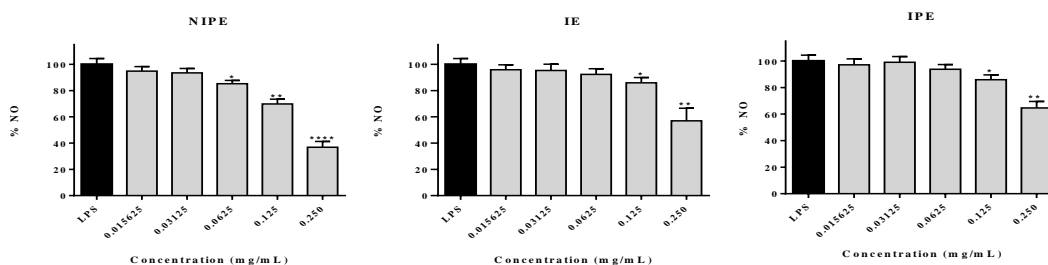
The extracts were not cytotoxic at concentrations up to 0.250 mg/mL and showed cellular viability greater than 90% (Figure 3). As so, this was the concentration chosen for the subsequent assay. The concentration that induces loss of 50% of cell viability ( $\text{IC}_{50}$ ) was



calculated. No noticeable differences were found between **NIPE** and **IPE**, which presented  $IC_{50}$  values of 0.791 and 0.787 mg/mL, respectively. **IE** showed  $IC_{25}$  of 0.795 mg/mL. The results obtained in this assay direct the extract concentration to be used in the NO reduction assay without affecting the cellular viability.

### 3.2.3.2 C. *ambrosioides* extracts decreases NO in LPS-stimulated macrophages

RAW 264.7 cells were pre-incubated with extracts of *C. ambrosioides*, at concentrations that did not compromise cell viability for 2 h and exposed to LPS for 22h. **NIPE** was the most effective sample in reducing NO levels in a dose-dependent manner ( $IC_{50} = 0.201$  mg/mL). **IPE** and **IE** presented similar reductive capacity ( $IC_{50} > 0.250$  mg/mL).



**Figure 4.** Effect in NO levels of RAW 264.7 cells pre-treated for 2 h with *C. ambrosioides* extracts (NIPE, IE, IPE), followed by 22 h co-treatment with 1  $\mu$ g/mL of LPS.

Despite the higher amount of phenolic compounds presented by IPE, the results obtained with this extract were not as good as those from the non-irradiated one. This leads us to believe that even if the phenolic compounds identified in the tested extracts are known for their anti-inflammatory action, other compounds, probably less polar, found in ENI are also responsible for this activity (Anand e Kaithwas, 2014; Mahir Kapl et al., 2017; Reitera Elke; Jiangb Qing and Christena Stephan, 2009). In fact, previous studies describe the presence of fatty acids in extracts of *C. ambrosioides*, that class is known for its volatility and greater sensitivity (Barros et al., 2013). As the best results were obtained with ENI, we believe that gamma radiation was able to degrade this class of compounds in the irradiated samples, preventing their expression in the assays.

**Table 3.** Effects of irradiated and non-irradiated extracts of *C. ambrosioides* (mg/mL) on inflammatory mediators.

<i>C. ambrosioides</i> L. extract	Cell-free assay		Cell assay
	LOX inhibition (IC <sub>50</sub> )	*NO scavenging (IC <sub>50</sub> )	NO reduction (IC <sub>50</sub> )
NIPE	0.416 ± 0.030 <sup>a</sup>	0.431 ± 0.040	0.201 ± 0.029
IE	0.400 ± 0.078 <sup>a</sup>	0.773 ± 0.091	> 0.250
IPE	0.488 ± 0.004 <sup>a</sup>	> 1000	> 0.250

### 3.3 Relation between gamma radiation exposure, chemical composition and anti-inflammatory potential of *C. ambrosioides* extracts

The abundance and diversity of phenolic compounds present in *C. ambrosioides* suggests potential pharmaceutical applications, being interesting to be included in RENISUS, an important list of medicinal plants published by the Brazilian government with the purpose of scientific research (Ministério da Saúde do Brasil, 2009). Ionizing radiation has been used as a food preservative and even plant extracts; nevertheless, studies have described that gamma radiation has the ability to alter the chemical composition of natural products (Vardhan e Shukla, 2017). In this study the anti-inflammatory potential of irradiated and non-irradiated extracts of *C. ambrosioides* was evaluated for the first time, and the chemical composition was related to anti-inflammatory activity, as discussed below.

The production of secondary metabolites is directly related to exogenous *stimuli*, such as ultraviolet radiation, high luminosity, water stress, among others. A living plant undergoing radiation is able to respond to this stimulus by increasing certain metabolites, studies showing that ionizing radiation is able to act directly on the phenylalanine ammonia lyase (PAL), a key-enzyme in the pathway of the phenylpropanoids that originates from shikimic acid precursor in the biosynthesis of flavonoids. According to Hussain et al., (2010), peaches subjected to radiation at a dose of 1.8 to 2 KGy presented an increase in phenolic content when compared to control; the authors attributed this result to the increase in PAL, also determined in the study.

Other authors studied the effect of gamma radiation on total phenolic compounds of mushrooms. Doses of 2.5 KGy were able to increase PAL by 4 times when compared to non-irradiated samples (Benoît et al., 2000). Similar results were found in a study carried out on *Citrus clementina* submitted to radiation at the dose of 0.3 KGy: there was a significant increase in the activity of PAL and consequently in the production of flavonoids in the irradiated samples (Oufedjikh et al., 2000).

The significant increase of kaempferol derivatives and quercetin- 3-*O*-rutinoside in **IPE** when compared to **NIPE** and **IE** was the main difference found herein, and it can be stated that the radiation had a direct influence on the concentration of **IPE** compounds, influencing the enzymatic activity of the plant.

In the assays related to the anti-inflammatory activity of *C. ambrosioides*, irradiated and non-irradiated extracts we found a similar potential in the inhibition of LOX, all extracts being able to inhibit this enzyme. When comparing the effect on •NO scavenging and NO levels, the most active extract was **NIPE**, demonstrating that, even with the increase of phenolic compounds occurred in **IPE**, these were not able to increase the anti-inflammatory potential of the species. Thus, the anti-inflammatory potential of *C. ambrosioides* may also be partially attributed to compounds present in the plant that were not identified in our study.

Some studies indicate the ionizing radiation as a stimulus to the antioxidant activity of plant species. Song et al. (2018) exposed a ginseng extract to a dose of gamma radiation (100KGy) higher than the one used in our study. The irradiated extract was able to express antimelanogenic activity and greater antioxidant potential when compared to the non-irradiated extract, the reducing sugars content also increasing. Ito et al. (2016) presented the effects of gamma radiation on apple pomace flour irradiated at doses until to 2 KGy, having reported higher antioxidant activity and higher concentration of phenolic compounds in irradiated samples at the intermediate dose of 1KGy, which shows that the increase of compounds is also related with the dose of radiation applied. However, when comparing the results described in the literature with those found in our work we can infer that radiation, besides affecting the concentration of phenolic compounds, is not necessarily related to the bioactivity under test. For example, Pereira et al., (2018) observed that irradiated aromatic herbs were not able to improve the antioxidant activity when compared to the non-irradiated samples: radiation was able to cause an increase in the phenolic compounds of the species, but this increase did not result in a better activity.

Thus, we believe that the increase in the concentration of certain compounds caused by gamma radiation may have been crucial in preventing the synergism of the primary chemical composition of the plant. Most of the compounds identified in the studied species have a known anti-inflammatory activity. However, variation in their concentration due to radiation may have caused a difference in the efficacy of the extracts for the scavenging and reduction of NO.

### ***Conclusion***

This is the first report on the effects of gamma radiation on extracts of *C. ambrosioides* and its anti-inflammatory potential. Different phenolic contents were found between the samples, IPE being the sample with the highest concentration of phenolic compounds, demonstrating that gamma radiation was responsible for this increase. Regarding inhibition of LOX, all samples tested showed the ability to inhibit the enzyme. The phytochemical alteration caused by the radiation was not able to improve the bioactivity of the sample when compared to the non-irradiated extract, in relation to the elimination NO. Although there is still a long way to verify the benefits of gamma radiation in extracts of *C. ambrosioides*, the results obtained in the present study show that the non-irradiated extract presented a better potential to act on inflammatory mediators.

### Acknowledgments

This work was supported by Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) under Project number 88881.135035/2016-01 from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The work was also supported by UID/QUI/50006/2019 with funding from FCT/MCTES through national funds, and by Programa de Cooperación Interreg V-A España – Portugal (POCTEP) 2014-2020 (project 0377\_IBERPHENOL\_6\_E).

### References

- Adami, M., Prudente, A. da S., Mendes, D.A.G.B., Horinouchi, C.D. da S., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., 2012. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. *J. Dermatol. Sci.* 66, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.02.015>
- Adegbola, P., Aderibigbe, I., Hamed, W., Omotayo, T., 2017. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease : a review 7, 19–32.
- Ahmad, A., Dempsey, S.K., Daneva, Z., Azam, M., Li, N., Li, P., Ritter, J.K., 2018. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>
- Alitonou, G.A., Sessou, P., Tchobo, F.P., Noudogbessi, J.P., Avlessi, F., Ou, B.Y., Menut, C., Villeneuve, P., Sohounhloue, D.C.K., 2012. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. *Int. J. Biosci.* 2, 58–66.
- Ambothi, K., Prasad, N.R., Balupillai, A., 2015. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.* 82, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.031>
- Anand, R., Kaithwas, G., 2014. Anti-inflammatory Potential of Alpha-Linolenic Acid Mediated Through Selective COX Inhibition : Computational and Experimental Data. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9857-6>

- Baldi, A., Choudhary, N., 2013. In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of chenopodium album extract. *Int. J. Green Pharm.* 7, 50. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.111614>
- Barbosa, M., Lopes, G., Ferreres, F., Andrade, P.B., Pereira, D.M., Gil-Izquierdo, Á., Valentão, P., 2017. Phlorotannin extracts from Fucales: Marine polyphenols as bioregulators engaged in inflammation-related mediators and enzymes. *Algal Res.* 28, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.009>
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Funct. Foods* 5, 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Benoît, M. a, D'Aprano, G., Lacroix, M., 2000. Effect of gamma-irradiation on phenylalanine ammonia-lyase activity, total phenolic content, and respiration of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 6312–6.
- Boller, S., Soldi, C., Marques, M.C.A., Santos, E.P., Cabrini, D.A., Pizzolatti, M.G., Zamprônio, A.R., Otuki, M.F., 2010. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 130, 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.001>
- Calado, G.P., Lopes, A.J.O., Junior, L.M.C., Das Chagas A. Lima, F., Silva, L.A., Pereira, W.S., Do Amaral, F.M.M., Garcia, J.B.S., Do Socorro De S. Cartágenes, M., Nascimento, F.R.F., 2015. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. *PLoS One* 10, 1–18.
- Calil Brondani, J., Reginato, F.Z., da Silva Brum, E., de Souza Vencato, M., Lima Lhamas, C., Viana, C., da Rocha, M.I.U.M., de Freitas Bauermann, L., Manfron, M.P., 2017. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. *J. Ethnopharmacol.* 202, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.011>
- Campanini, M.Z., Pinho-Ribeiro, F.A., Ivan, A.L.M., Ferreira, V.S., Vilela, F.M.P., Vicentini, F.T.M.C., Martineza, R.M., Zarpelon, A.C., Fonseca, M.J.V., Faria, T.J., Baracat, M.M., Verri, W.A., Georgetti, S.R., Casagrande, R., 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>
- Camponogara, C., Casoti, R., Brusco, I., Piana, M., Boligon, A.A., Cabrini, D.A., Trevisan, G., Ferreira, J., Silva, C.R., Oliveira, S.M., 2019a. *Tabernaemontana catharinensis* leaves effectively reduce the irritant contact dermatitis by glucocorticoid receptor-dependent pathway in mice. *Biomed. Pharmacother.* 109, 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.132>
- Camponogara, C., Casoti, R., Brusco, I., Piana, M., Boligon, A.A., Cabrini, D.A., Trevisan, G., Ferreira, J., Silva, C.R., Oliveira, S.M., 2019b. *Tabernaemontana catharinensis* leaves exhibit topical anti-inflammatory activity without causing toxicity. *J. Ethnopharmacol.* 231, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.021>
- Camponogara, C., Silva, C.R., Brusco, I., Piana, M., Faccin, H., de Carvalho, L.M., Schuch, A., Trevisan, G., Oliveira, S.M., 2019c. *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF-κB pathways without causing toxicological effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 229,

190–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.011>

Chakravarty B. and Sen S., 2001. *BioPlant* 54.pdf.

Coelho, F.C., Tirloni, C.A.S., Marques, A.A.M., Gasparotto, F.M., Lívero, F.A. dos R., Gasparotto Junior, A., 2019. Traditional Plants Used by Remaining Healers from the Region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *J. Relig. Health* 58, 572–588. <https://doi.org/10.1007/s10943-018-0713-0>

Costa, M.V.L., Tavares, E.S., 2006. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (*Chenopodiaceae*) - Erva-de-Santa Maria. *Rev. Bras. Plantas Med.* 8, 63–71.

da Silva, M.G.C., Amorim, R.N.L., Câmara, C.C., Fontenele Neto, J.D., Soto-Blanco, B., 2014. Acute and Sub-Chronic Toxicity of Aqueous Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Leaves in Rats. *J. Med. Food* 17, 979–984. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0134>

de Brum, T.F., Camponogara, C., da Silva Jesus, R., Belke, B.V., Piana, M., Boligon, A.A., Pires, F.B., Oliveira, S.M., da Rosa, M.B., de Freitas Bauermann, L., 2016. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. *J. Ethnopharmacol.* 193, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.075>

Devi, K.P., Malar, D.S., Nabavi, S.F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S.M., Daglia, M., 2015. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol. Res.* 99, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>

Graciliana Lopes, Carla Sousa, Luís R. Silva, Eugénia Pinto, Paula B. Andrade, João Bernardo, Teresa Mouga, P.V., 2012. Can Phlorotannins Purified Extracts Constitute a Novel Pharmacological Alternative for Microbial Infections with Associated Inflammatory Conditions? *J. Ethnopharmacol.* 145, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.040>

Grassi, L.T., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., da Silva Buss, Z., Monguilhott, E.D., Fröde, T.S., da Silva, K.A.B.S., de Souza, M.M., 2013. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J. Ethnopharmacol.* 145, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.040>

Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., Arici, M., Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., 2011. Effect of Gamma Irradiation on Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of *Satureja Hortensis*, *Thymus Vulgaris*, and *Thymbra Spicata* from Turkey. *Food Sci. Technol.* 33, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.015>

Hussain, P.R., Wani, A.M., Meena, R.S., Dar, M.A., 2010. Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus persica* Bausch, Cv. Elberta). *Radiat. Phys. Chem.* 79, 982–989. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.03.018>

Ibironke, G.F.; Ajiboye, K.I., 2007. *ibironke 2007.pdf*.

Ito, V.C., Alberti, A., Avila, S., Spoto, M., Nogueira, A., Wosiacki, G., 2016. Effects of gamma radiation on the phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of apple pomace flour during storage using multivariate statistical techniques. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.015>

Jesus, R.S., Piana, M., Freitas, R.B., Brum, T.F., Alves, C.F.S., Belke, B. V., Mossmann, N.J., Cruz, R.C., Santos, R.C.V., Dalmolin, T. V., Bianchini, B. V., Campos, M.M.A.,

- Bauermann, L. de F., 2018. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian J. Microbiol.* 49, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.012>
- Joshi, V., Umashankara, M., Ramakrishnan, C., Nanjaraj Urs, A.N., Suvilesh, K.N., Velmurugan, D., Rangappa, K.S., Vishwanath, B.S., 2016. Dimethyl ester of bilirubin exhibits anti-inflammatory activity through inhibition of secretory phospholipase A2, lipoxygenase and cyclooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 598, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.003>
- Khan, A., Alsahli, M., Rahmani, A., 2018. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med. Sci.* 6, 33. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>
- Khan, A.Q., Khan, R., Qamar, W., Lateef, A., Ali, F., Tahir, M., Muneeb-U-Rehman, Sultana, S., 2012. Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced NF- $\kappa$ B and COX-2 expression in mouse skin: Abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and proinflammatory cytokine production. *Food Chem. Toxicol.* 50, 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.10.043>
- KUMAR, R., MISHRA, A., DUBEY, N., TRIPATHI, Y., 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.017>
- Lende, A.B., Kshirsagar, A.D., Deshpande, A.D., Muley, M.M., Patil, R.R., Bafna, P.A., Naik, S.R., 2011. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. *Inflammopharmacology* 19, 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0086-4>
- Li, S., Tan, H., Wang, N., Zhang, Z., Lao, L., Wong, C., Feng, Y., 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- LIMA, C.M. et al., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe 8, 1–6.
- Loria, V., Dato, I., Graziani, F., Biasucci, L.M., 2008. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/135625>
- Mahir Kapl, H., Ok, F., Demir, E., 2017. Alpha-linolenic Acid Attenuates Lipopolysaccharide Induced Cystitis, *International Journal of Pharmacology.* <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.649.653>
- Mashima, R., Okuyama, T., 2015. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol.* 6, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.006>
- Mello, J., Simões, C., Schenkel, E., Auler Mentz, L., Petrovick, P., 2017. Farmacognosia do produto natural ao medicamento.
- Meyer, O., 2003. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol. Lett.* 140–141, 21–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00492-7)

- Milani, G.B., Camponogara, C., Piana, M., Silva, C.R., Oliveira, S.M., 2019. Cariniana domestica fruit peels present topical anti-inflammatory efficacy in a mouse model of skin inflammation. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 392, 513–528. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1594-1>
- OECD, 2001. The Well-Being of Nations - The Role of Human and Social Capital. OECD Pap. 18. <https://doi.org/10.1111/1467-954X.00194>
- OECD Annual Report 2008, 2008. <https://doi.org/10.1787/annrep-2008-en>
- OMS, 2008. MINISTÉRIO DA SAÚDE ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE Brasília – DF 2008.
- Otuki, M.F., Bernardi, C.A., Prudente, A.S., Laskoski, K., Gomig, F., Horinouchi, C.D.S., Guimarães, C.L., Ferreira, J., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V., Cabrini, D.A., 2011. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 56–62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00689.x>
- Oufedjikh, H., Mahrouz, M., Amiot, M.J., Lacroix, M., 2000. Effect of  $\gamma$ -irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. *J. Agric. Food Chem.* 48, 559–565. <https://doi.org/10.1021/jf9902402>
- Park, S.H., Seo, W., Eun, H.S., Kim, S.Y., Jo, E., Kim, M.H., Choi, W.M., Lee, J.H., Shim, Y.R., Cui, C. hao, Kim, S.C., Hwang, C.Y., Jeong, W. Il, 2016. Protective effects of ginsenoside F2 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 1713–1719. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.009>
- Pereira, D.M., Correia-da-Silva, G., Valentão, P., Teixeira, N., Andrade, P.B., 2014. Anti-Inflammatory Effect of Unsaturated Fatty Acids and Ergosta-7,22-dien-3-ol from *Marthasterias glacialis*: Prevention of CHOP-Mediated ER-Stress and NF- $\kappa$ B Activation. *PLoS One* 9, e88341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088341>
- Pereira, D.M., Silva, T.C., Losada-Barreiro, S., Valentão, P., Paiva-Martins, F., Andrade, P.B., 2017. Toxicity of phenolipids: Protocatechuic acid alkyl esters trigger disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation in macrophages. *Chem. Phys. Lipids* 206, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.05.013>
- Pereira, E., Antonio, A.L., Barreira, J.C.M., Verde, S.C., Barros, L., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Evaluation of gamma-irradiated aromatic herbs: Chemometric study of samples submitted to extended storage periods. *Food Res. Int.* 111, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.051>
- Pereira, E., Barros, L., Dueñas, M., Antonio, A.L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Gamma irradiation improves the extractability of phenolic compounds in *Ginkgo biloba* L. *Ind. Crops Prod.* 74, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.039>
- Pereira, W.S., Ribeiro, B.P., Sousa, A.I.P., Serra, I.C.P.B., Mattar, N.S., Fortes, T.S., Reis, A.S., Silva, L.A., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., Nascimento, F.R.F., 2016. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 127, 602–605. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.018>
- Piana, M., Camponogara, C., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., 2017. *Solanum paranense* Extracts and Solanine Present Anti-Inflammatory Activity in an Acute Skin Inflammation Model in Mice. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2017, V.



<https://doi.org/10.1155/2017/4295680>

- Piana, M., Silva, M.A., Trevisan, G., De Brum, T.F., Silva, C.R., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., Zadra, M., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Tonello, R., Laporta, L.V., De Freitas, R.B., Belke, B.V., Da Silva Jesus, R., Ferreira, J., Athayde, M.L., 2013. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *J. Ethnopharmacol.* 150, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.040>
- Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical Safety Assessment: Current Gaps, Challenges, and Approaches in Identifying Translatable Biomarkers of Drug-Induced Liver Injury. *Clin. Lab. Med.* 31, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.004>
- Randall, R.J., Lewis, A., [s.d.]. The folin by oliver.
- Reitera Elke; Jiangb Qing and Christena Stephan, 2009. NIH Public Access 28, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.01.003>. Anti-inflammatory
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Sanchez, V., Vázquez-Martínez, J., López, M.G., 2019. Antioxidant, intestinal immune status and anti-inflammatory potential of *Chenopodium ambrosioides* L. in fish: In vitro and in vivo studies. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.059>
- Ribeiro, V.P., Arruda, C., El-Salam, M.A., Bastos, J.K., 2018. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. *Pharm. Biol.* 56, 253–268. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1454480>
- Ricciotti, E., FitzGerald, 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Art Thromb Vas Biol* 31, 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>. Prostaglandins
- Riol-Blanco, L., Ordovas-Montanes, J., Perro, M., Naval, E., Thiriot, A., Alvarez, D., Paust, S., Wood, J.N., Von Andrian, U.H., 2014. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature* 510, 157–161. <https://doi.org/10.1038/nature13199>
- Roth, S.H., 2012. Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs* 72, 873–879. <https://doi.org/10.2165/11633740-000000000-00000>
- S., P., 2011. Toxicological screening. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 4, 275–286. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(84\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0273-2300(84)90027-8)
- Sadaf, S., Emad, S., Siddiqui, N.A., Ghafoor, S., Yousuf, S., Jabeen, B., Haider, S., Perveen, T., 2017. Enhancement of memory function by antioxidant potential of *Nigella sativa* L. oil in restrained rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30, 2039–2046.
- Sadat-Hosseini, M., Farajpour, M., Boroomand, N., Solaimani-Sardou, F., 2017. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants in the south of Kerman, Iran. *J. Ethnopharmacol.* 199, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.006>
- Santos, M. et al., 2018. Effect of freezing and atomization on bioactive compounds in cagaita (*Eugenia dysenterica* DC ) fruit 2061, 3–8.
- Sharma et al., 2007. Effect of Insulin and its Combination with Resveratrol or Curcumin in Attenuation of Diabetic Neuropathic Pain: Participation of Nitric Oxide and TNF-alpha Sameer. *Phyther. Res.* 21, 278–283. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Siddiqui, M.Z., 2011. *Boswellia serrata*, a potential antiinflammatory agent: an overview. *Indian J. Pharm. Sci.* 73, 255–61. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.93507>

- Silva, J.M., Conegundes, J.L.M., Mendes, R.D.F., Pinto, N.D.C.C., Gualberto, A.C.M., Ribeiro, A., Gameiro, J., De Aguiar, J.A.K., Castanon, M.C.M.N., Scio, E., 2015. Topical application of the hexane fraction of *Lacistema pubescens* reduces skin inflammation and cytokine production in animal model. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 1613–1622. <https://doi.org/10.1111/jphp.12463>
- Silva, T.C., de Andrade, P.B., Paiva-Martins, F., Valentão, P., Pereira, D.M., 2017. In vitro anti-inflammatory and cytotoxic effects of aqueous extracts from the edible sea anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030653>
- Simpson, B.S., Luo, X., Wang, J., Song, Y., Claudie, D.J., Garg, S., Smith, N.M., McKinnon, R.A., Semple, S.J., 2015. Development and evaluation of a topical anti-inflammatory preparation containing *Dodonaea polyandra* extract. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 18, 578–599. <https://doi.org/10.18433/J38P57>
- Song, H.Y., Kim, H.M., Kim, W.S., Byun, E.H., Jang, B.S., Choi, D.S., Byun, E.B., 2018. Effect of gamma irradiation on the anti-oxidant and anti-melanogenic activity of black ginseng extract in B16F10 melanoma cells. *Radiat. Phys. Chem.* 149, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.03.008>
- Song, K., Zhang, J., Zhang, P., Wang, H.-Q., Liu, C., Li, B.-M., Kang, J., Chen, R.-Y., 2015. Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 17, 482–490. <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1042872>
- Stanimirovic, J., Obradovic, M., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., Pitt, S.J., Stewart, A.J., Isenovic, E.R., 2016. A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 54, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.007>
- Stewart, E.M., 2001. STEWART, E. M. radiation Princ. Appl. 37–76.
- Taghipour, F., 2004. Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. *Water Res.* 38, 3940–3948. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.016>
- Thiombiano, A.M.E., Adama, H., Jean, B.M., Bayala, B., Nabèrè, O., Samson, G., Roland, M.N., Moussa, C., Martin, K., Jeanne, M.F., Germaine, N.O., 2014. In vitro Antioxidant, Lipoxygenase and Xanthine Oxidase inhibitory activity of fractions and macerate from *Pandiaka angustifolia* ( vahl ) Hepper 4, 9–13. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40102>
- Trivellatograssi, L., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., Da Silva Buss, Z., Monguilhott, E.D., Fröde, T.S., Da Silva, K.A.B.S., De Souza, M.M., 2013. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J. Ethnopharmacol.* 145, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.040>
- Vardhan, P.V., Shukla, L.I., 2017. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 967–979. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1344788>
- Vidal, P.J., López-nicolás, J.M., Gandía-herrero, F., García-carmona, F., 2014. Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *FOOD Chem.* 154, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.014>
- WHO, 1999. WHO monographs on selected medicinal plants 1.
- Xiao, X., Xie, H., Jian, D., Deng, Y., Chen, X., Li, J., 2015. Rebounding triad (severe itching, dryness and burning) after facial corticosteroid discontinuation defines a specific class of

corticosteroid-dependent dermatitis. *J. Dermatol.* 42, 697–702.  
<https://doi.org/10.1111/1346-8138.12877>

Yang, R., Yuan, B., Ma, Y., Zhou, S., Liu, Y., 2016. The anti-inflammatory activity of licorice , a widely used Chinese herb. *Pharm. Biol.* 0, 000.  
<https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1225775>

Zipp, F., Aktas, O., 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 29, 518–527.



**CAPÍTULO 2:** Segurança e potencial anti-inflamatório do extrato liofilizado de *C. ambrosioides* L. através de modelos *in vivo*

---



## **CAPÍTULO 2: Segurança e potencial anti-inflamatório do extrato liofilizado de *C. ambrosioides* L. através de modelos *in vivo***

### 2.1 APRESENTAÇÃO

Com o passar dos anos tendo como objetivo a redução do uso de animais na pesquisa, os ensaios *in vitro* elegem os compostos e doses capazes de promover um efeito farmacológico. Os ensaios *in vivo* vêm para complementar resultados, assim ocorre o desenvolvimento científico. Tendo em vista a utilização segura de espécies vegetais pela população, estudos de toxicidade *in vitro* e posteriormente *in vivo* vêm sendo realizados. Ensaios com roedores (Wistar e Swiss) são de grande importância devido à similaridade fisiológica com o organismo humano, e o bem-estar dos animais tem sido foco de questões éticas, sendo os protocolos experimentais melhorados com o tempo.

As plantas medicinais são, geralmente, consideradas seguras pela população, no entanto, isso pode ser um equívoco, já que sua ação pode causar efeitos colaterais, e por esse motivo, a pesquisa com espécies utilizadas para esse fim se faz muito importante para comprovação de sua eficácia. Comparada à propriedade dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer desprezível. Isto, entretanto, não é verdade. Considerando o potencial de extratos vegetais utilizados como medicamentos em pacientes, destaca-se a necessidade de estudos continuados para garantir tanto a segurança do consumidor quanto manter a eficácia terapêutica. Assim, ensaios de toxicidade e potencial farmacológico *in vivo* são uma ótima saída para elucidar a segurança e a terapêutica da espécie *Chenopodium ambrosioides* L.

Desse modo, o presente capítulo apresenta o estudo de toxicidade e potencial anti-inflamatório *in vivo* de *C. ambrosioides* L. levando em consideração a larga utilização da espécie e suas diversas propriedades biológicas potencialmente positivas para a saúde pública, além de sua inserção no RENISUS. Os resultados encontram-se sob forma de manuscrito científico o qual será submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*.





**MANUSCRITO 2:** Can lyophilized extract of *C. ambrosioides* L. reduces croton oil-induced skin inflammation without causing toxicity in animals?

---



**Can lyophilized extract of *C. ambrosioides* L. reduces croton oil-induced skin inflammation without causing toxicity in animals?**

Roberta S. Jesus<sup>a</sup>, Amanda S. Heck<sup>b</sup>, Isabel Araldi<sup>b</sup>, Camille G. <sup>b</sup>, Fernanda Z. Reginatto<sup>a</sup>, Robson B. de Freitas, Thiele F. de Brum<sup>a</sup>, Carolina D. <sup>a</sup>, Fernanda Pires<sup>a</sup>, Cibele Lhamas<sup>c</sup>, Natháli S. Pegoraro<sup>d</sup>, Camila Camponogara<sup>d</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>d</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria,

<sup>b</sup>Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria,

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

<sup>d</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria-RS, Brazil

## **Abstract**

**Ethnopharmacological relevance:** *Chenopodium ambrosioides* L., popularly known as Erva-de-Santa-Maria, is a native species from South America. The branches of species are used in folk medicine for several purposes, including to treat inflammatory process, insect and snake bites and wounds. Due to its wide use, this specie was inserted in the RENISUS (National List of Medicinal Plants of SUS Interest) by the Brazilian Ministry of Health, which encourage researchers to validate the pharmacological activities of several plants used in folk medicine.

**Aim of the study:** To identify the phytochemical composition and to evaluate the safety and anti-inflammatory efficacy of *C. ambrosioides* lyophilized extract in murine animals.

**Material and methods:** The lyophilized extract of *Chenopodium ambrosioides* (LEC) was evaluated for its chemical composition by mass spectrometry. The toxicological analyses (hematological, biochemical, physical, behavioral and oxidative damage parameters) of LEC were observed in male and female *Wistar* rats from acute oral toxicity (single administration; 2000 mg/kg) and repeated oral toxicity study (50, 100 and 200 mg/kg doses for 28 days). The anti-inflammatory efficacy of LEC was evaluated from a skin inflammation model induced by topical application of croton oil (1 mg/ear) in *Swiss* mice. The LEC (0.01-1 mg/ear) and *B. serrata* extract (positive control; 1 mg/ear) solutions<sup>7</sup> (diluted in acetone; 20  $\mu$ L/ear) were topically applied immediately after croton oil application and inflammatory parameters (ear edema and inflammatory cells infiltration) were evaluated. **Results:** Mass analysis revealed the presence of 6-hydroxycoumarin, p-coumaric acid, ferulic acid, quercetin-3-O-rutinoside, apigenin, quercitrin, quercitin and kaempferol. In the acute oral toxicity study, the LEC was classified as safe (category 5) according to the OECD guidelines. The repeated oral administration of LEC increased only the AST enzyme activity, observed in females treated with 50 mg/kg. Other toxicological parameters were not altered by the oral treatment with LEC (50-200 mg/kg) in both males and females. LEC and *B. serrata* reduced the croton oil-induced ear edema by  $47.18 \pm 4.59\%$  and  $34.23 \pm 4.78\%$  (at 1mg/ear), respectively. The same treatments also reduced the croton oil-induced inflammatory cells infiltration (seen by myeloperoxidase activity) by  $40.71 \pm 14.71$  to LEC (1 mg/ear) and  $35.93 \pm 9.97\%$  to *B. serrata* (1 mg/ear). **Conclusion:** Our results demonstrate the safety profile of *C. ambrosioides* and its potential as a topical anti-inflammatory agent to treat skin inflammatory disorders, justifying its use in folk medicine.

## ***Introduction***

In Brazil, traditional knowledge about vegetable species is the basis of popular medicine and have been accepted as one of the main sources of drug development. However, it is also important to investigate about their toxic aspects since the phytochemical compounds present in plants, vegetables and herbs, as well as, their actions may cause adverse effects that limit their long-term use (Calil Brondani et al., 2017; Coelho et al., 2019; Sadat-Hosseini et al., 2017). In this sense, the search about the safety profile of vegetable species becomes necessary and the focus of toxicological assays in medicinal plants has gained prominence since may predict possible damage to humans and avoid an exacerbation of pre-existing pathological conditions by medicinal plants treatment (Meyer, 2003; S., 2011).

One example is *Chenopodium ambrosioides* L. (syn: *Dysphanya ambrosioides* L.) traditionally known in Brazil as “Erva-de-Santa-Maria”. Its origin comes from Central and South America, and in Brazil it is native to the South and Southeast. *C. ambrosioides* is a perennial shrub, very branched and up to one meter high, strongly aromatic, with simple and alternating leaves, and with small flowers arranged in dense spikes (LORENZI e MATOS, 2002). In folk medicine, this specie is used in the form of teas, infusions and poultices for several purposes, including to treat inflammatory and painful process, snake and insect bites and wounds (Costa e Tavares, 2006; KUMAR et al., 2007; Song et al., 2015; Trivellatograssi et al., 2013). Besides medicinal use, this specie is also empirically described by native people as toxic. Some cases of intoxication with essential oil (used in large amounts) have shown in human and rats, including toxic effects in kidney, liver and gut (Pereira et al., 2016). Moreover, the native people report that the toxicological problems may be abolished by mixing the leaves with milk before the ingestion, being this the most traditional form of popular use in Brazil (da Silva et al., 2014; Pereira et al., 2016). In this sense, growing studies have demonstrated that different extracts of *C. ambrosioides* leaves, after an oral administration, did not induce significant acute and subchronic toxic alterations, suggesting that its use present no risk in adequate therapeutic doses (da Silva et al., 2014; Pereira et al., 2016).

Due to the wide popular use of medicinal plants, in 2009, the Brazilian Ministry of Health created the RENISUS, a National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System, with the purpose of encouraging the scientific investigation of plants widely used with emphasis on Brazilian folk medicine (BRASIL, 2009). In this perspective, several pharmacological studies have been carried out with *C. ambrosioides*, many of which justify

its popular use, including anti-inflammatory action in different inflammatory models (Calado et al., 2015; Ibrinke, G.F.; Ajiboye, 2007; Reyes-Becerril et al., 2019).

Skin inflammation comprehends a complex process, which involves the interaction between different skin cells (residents or not), resulting in the development of erythema, vascular permeability alterations (vasodilatation and edema) and inflammatory cells infiltration (Boller et al., 2010; Camponogara et al., 2019a). To control skin inflammation, anti-inflammatory drugs, such as glucocorticoids are widely used. Despite the effectiveness proved, these current therapeutic treatments may frequently exhibit adverse effects (local and systemic), limiting its long-term use (Roth, 2012; Simpson et al., 2015; Xiao et al., 2015).

As alternative, extracts and isolated compounds from herbal medicine have been studied to discover new effective and safe topical anti-inflammatory drugs (Camponogara et al., 2019c, 2019b). Trivellatograssi et al., 2013 demonstrated the topical anti-inflammatory effect of ethanolic extract (incorporated into a semisolid formulation) of *C. ambrosioides* in a croton oil-induced skin inflammation model. In this context, we evaluated the safety profile and topical anti-inflammatory effect of lyophilized extract (dissolved in acetone) of *C. ambrosioides* L. leaves by *in vivo* toxicological and inflammatory models.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Standards and reagents**

All chemicals were of analytical grade. The standards 6-hydroxycoumarin, *p*-coumaric acid, rutin, quercitrin, quercetin, apigenin and kaempferol were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ferulic acid was obtained from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). All the standards were of analytical grade with a minimum of 95% purity and were used as received.

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) system. Methanol and acetonitrile (LC-MS grade) were obtained from Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Croton oil, hexadecyltrimethyl ammoniumbromide (HTAB), tetramethylbenzidine (TMB), sodium acetate, acetic acid, formic acid, ammonium acetate, ammonium formate and ammonium hydroxide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Isoflurane was obtained Baxter (São Paulo, Brazil). Standard stock solutions ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were prepared by dissolving appropriate amounts of substances in LC-MS grade methanol, high purity nitrogen (99.999%) obtained from Linde (Munich,

Germany). All the solutions were stored in amber glass recipients at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  until their use. Work solutions of the studied phenolic compounds were prepared by dilution of the stock solutions in the respective solvents according to the optimization experiment performed.

## 2.2 Plant material

*C. ambrosioides* L. was collected in Urugaiana, Rio Grande do Sul, Brazil (latitude  $57\text{ m}$ ,  $29^{\circ}$  latitude,  $45'20$ ,  $12''$  S, longitude  $57^{\circ} 4'0.28''$  W), in January 2017. The specie was identified, and a sample was archived in herbarium of Biology Department of Federal of Santa Maria under the registration number SMDB 137015.

## 2.3 Obtention of the extract

The vegetal material was dried in air circulation oven ( $40^{\circ}\text{C}$ ) and it was powdered. *C. ambrosioides* L. was macerated with ethanol 70% (v/v) and the mixture was shaken daily for one week. The vegetal extract was filtered, and the ethanol was renewed. After filtration, the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure in rotatory evaporator to remove ethanol, the aqueous extract was obtained, and then lyophilized resulting in the lyophilizate extract of *C. ambrosioides* (LEC).

## 2.4 UHPLC-ESI-MS/MS

### 2.4.1 Sample treatment and method conditions

The cartridges were conditioned with 6 mL of MeOH:0.2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1:1, v/v) and equilibrated with 6 mL of 0.1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . A fixed volume of 2 mL of the obtained extract with a final MeOH:H<sub>2</sub>O: $\text{CH}_3\text{COOH}$  composition of 20:80:0.1 (v/v) was percolated with a 2 mL  $\text{min}^{-1}$  flow rate, followed by washing with 2 mL of 0.1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Lastly, the retained analytes were eluted with 2 mL of MeOH.

The elution gradient was composed of 0.1% acetic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at a constant flow rate ( $800\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) according to the following elution program: 8.0% B (0.00-0.10 min); 8.0-25.8% B (0.10-3.45 min); 25.8-54.0% B (3.45-6.90 min); 54.0-100.0% B (6.90-7.00 min); and 100.0% B (7.00-9.00 min).

The chromatographic effluent generated until 7.0 min into the run was ionized in an electrospray ionization source (ESI), which was optimized to give the best response for the analytes, especially for intensity to give signal stability. The optimized parameters for ESI

were a gas flow of  $11 \text{ L min}^{-1}$ , a nebulizer of 30 psi, a capillary voltage of  $\pm 2.4 \text{ kV}$  and a gas temperature of  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , with nitrogen used as the drying gas. The compounds were subsequently analyzed in an Agilent 6430 Triple Quadrupole mass spectrometer operating in the *multiple reaction monitoring* (MRM) mode with a resolution of  $0.7 \text{ m/z}$  (FWHM). High purity nitrogen (99.999%) was used as the gas for inducing collision according methodology describe by Faccin et al., 2017.

## **2.5 Experimental animals**

Adult male and female *Wistar* rats (160-200 g) and *Swiss* male mice (25-30g), were maintained under experimentation appropriate conditions (controlled temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12h light-dark cycle) and fed with laboratory standard chow and free access to water. The animals were segregated according to gender and were allowed to adjust to the new environment for 5 days before the study started and acclimatized to the experimental rooms at least 1h before performing the tests. All experiments were conducted following animal care and use in accordance to the national legislation (Guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA) and guidelines of *in vivo* experimentation reported by Mcgrath and Lilley (2015). The experiments were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria - CEUA/UFSM (process number 057/2014 and 3377260718/2018). The number of animals and the amount of irritant agent employed were the minimum necessary to show consistent effects of the topical treatments.

## **2.6 Toxicity study**

### **2.6.1 Acute oral toxicity study**

The acute oral toxicity study was performed as per the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 423 guidelines (OECD, 2001). Rats of each sexual category (n=6) were divided into two groups: control and test groups. Control group received water as vehicle while the test group received an oral dose of 2000 mg/kg of LEC. The dose used in the experiment of acute toxicity was selected from one of four fixed levels, 5, 50, 300, or 2000 mg/kg, as described in the OECD guide. All the experimental animals were observed for their mortality and clinical signs of toxicity (general behavior, respiratory patterns, cardiovascular signs, motor activities, reflexes and changes in skin and fur texture) at 30 min, 2, 6 and 12 h and thereafter once a day for 14 days following the treatment. Body weights and



food consumption were recorded daily throughout the study period. On the 15th day, the rats were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.), received tramadol analgesia (8 mg/kg i.p.) and were euthanized by cardiac puncture and subjected to gross pathological examination of all the major internal organs such as brain, heart, lungs, liver, kidney, spleen, adrenals and gonads.

### *2.6.2 Repeated doses oral toxicity study*

LEC was administered by gavage, daily in the morning, for 28 days. The animals were divided in 4 groups with 5 females and 5 males each, totalizing 40 animals used in the experiment, according to experimental protocol OECD n° 407 (OECD, 2008). These groups were divided according to the administered dose: 50 mg/Kg, 100 mg/Kg and 200 mg/Kg; to the control group was administered distilled water. The doses were chosen according to previous results of our research group.

Physiological data, such as weight and food intake, and abnormal behavioral changes were analyzed throughout the study. After anesthesia with pentobarbital, the animals were euthanized and the macroscopic evaluation of the organs, liver, spleen and kidney was performed to determine the relative weights. Blood samples were also collected for laboratory evaluation, including hematological and biochemical parameters.

### *2.6.3 Biochemical and hematological parameters*

To evaluate the levels of glucose (GLU), total cholesterol (TCHOL), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), coagulated blood serum was used before centrifugation (4000 rpm for 10 min). Using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin / Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000). Total blood was analyzed for hematological parameters: red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), platelets (PLT) and leukocyte total count were determined by using an automatic veterinary counter Mindray BC 2800.

### *2.6.4 Lipid peroxidation by TBARS method*

Before the determination of TBARS, the concentration of tissue protein was determined according Randall and Lewis (1951). Lipid peroxidation was determined through the TBARS assay, which measures malondialdehyde (MDA), a product formed after the

reaction between lipid peroxides and thiobarbituric acid (TBA). The technique consists in heating the biological material to be analyzed in the presence of TBA under acidic conditions and by spectrophotometry to measure the formation of a color-pink product. This reaction is described by Buege and Aust (1987) in which the compound absorbs maximally at 532 nm. The results were expressed by nmoles TBARS/mg protein.

## ***2.7 Anti-inflammatory effect of *Chenopodium ambrosioides****

### *2.7.1 Ear edema measurement*

The mice ear thickness was measured employing a digital micrometer (Digimess, São Paulo, Brazil), which was positioned near to the ear tip and distal to the cartilaginous grooves. For this, animals were previously anesthetized with isoflurane (2%) and the ear thickness was measured before (basal measure) and 6h after the croton oil or croton oil plus treatments administration. Results were expressed as the change in ear thickness ( $\mu\text{m}$ ) and the increase in the mice ear thickness at 6h compared to the basal measure was characterized as edema (Camponogara et al., 2019a).

### *2.7.2 Topical treatments*

*C. ambrosioides* (0,01-1 mg/ear) and *B. serrata* crude extracts (1 mg/ear; used as positive control) (Siddiqui, 2011), as well as the irritant agent croton oil (1 mg/ear), were solubilized in acetone (20  $\mu\text{L}$ /ear) and topically applied to the entire surface of the mice right ear.

### *2.7.3 Croton oil-induced ear edema model*

Acute skin inflammation was induced by a single croton oil topical administration (1 mg/ear). Topical treatments were applied immediately after croton oil administration and the ear thickness was measured before and at 6h after the treatment with the irritant agent, according to the methodology described by Camponogara et al. (2019b).

### *2.7.4 Myeloperoxidase (MPO) activity measurement*

The neutrophil infiltration to damaged tissue was assessed employing MPO activity measurement, once its activity is directly related to the amount of these cells infiltrated in the tissue. Six hours after receiving croton oil and treatments, the MPO activity was evaluated in mice ear samples according to the methodology previously described (Oliveira et al., 2014;

Pegoraro et al., 2017; Camponogara et al., 2019a). Results were expressed as optical density (OD) per mL of sample.

### 2.8 Statistical analysis

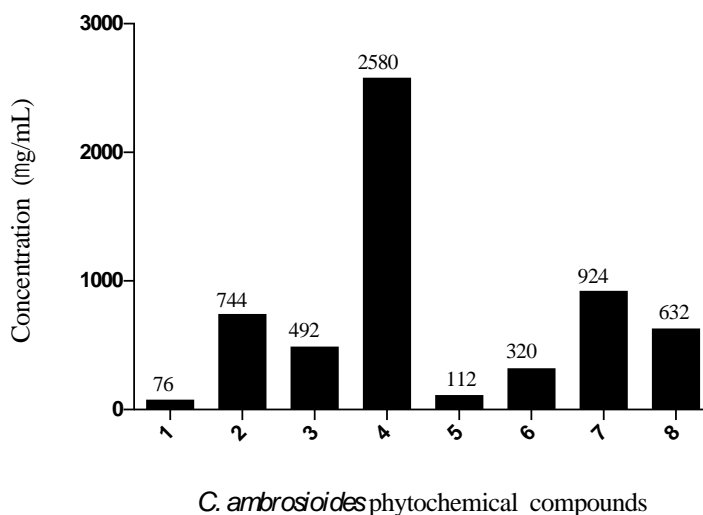
The *in vivo* results were expressed as mean + standard error of the mean (SEM) and mean  $\pm$  standard deviation (SD) to anti-inflammatory and toxicological evaluation, respectively. We calculated the maximum inhibitory effect based on each treatment's capability to reduce the evaluated inflammatory parameters with regard to the control group's (croton oil) response, which we considered as 100% of the inflammatory effect. The parametric data were statistically analyzed employing one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni or Tukey post hoc or Student's t-test. The non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's tests. (GraphPad 6.0 Software; San Diego, CA, USA). All results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1 UHPLC-ESI-MS/MS

Chemical analysis by *UHPLC-ESI-MS/MS* showed the presence of 6-hydroxycoumarin (**1**), *p*-coumaric acid (**2**), ferulic acid (**3**), quercetin-3-*O*-rutinoside (**4**), apigenin (**5**), quercitrin (**6**), quercetin (**7**) and kaempferol (**8**) (**Fig.1**). The higher concentration presented was from quercetin-3-*O*-rutinoside, with 2580  $\mu\text{g/mL}$ , followed by kaempferol, 924  $\mu\text{g/mL}$ . Our results are similar to the ones published by Barros et al. (2013), where the authors identified a gamma of phenolic compounds in the hydroethanolic extract of *C. ambrosioides* and the higher concentration ones were the same as found in our study.

The results obtained are in agreement with a research realized by Jesus et al., (2018), which showed the presence of quercetin-3-*O*-rutinoside as the majority compound, with 12.5 mg/g in crude extract and fractions of *C. ambrosioides*. The same happened with the chemical characterization obtained through a mass spectrophotometer, which revealed the presence of sixteen compounds having as major components quercetin and kaempferol derivatives (SÁ, 2018).



**Fig. 1.** Phytochemical composition of *C. ambrosioides* lyophilized extract by UHPLC-ESI-MS/MS. 6-hydroxycoumarin (1), *p*-coumaric acid (2), ferulic acid (3), quercetin-3-*O*-rutinoside (4), apigenin (5), quercitrin (6), quercetin (7) and kaempferol (8).

To contribute to the research and to add scientific knowledge about the *C. ambrosioides* safe use, based on its popular use for the treatment of a range of diseases, the evaluation of the possible toxic effects and physiological changes caused by the administration of this species are necessary.

Thus, the results obtained in this study provide us information that guides possible safe doses of LEC, through tests related to acute administration at the dose of 2000 mg/kg and the repeated doses test of 50, 100 and 200 mg/kg doses based on protocols recommended by OECD 407 and OECD 423, respectively. In view of the physiological parameters, which are an important standard for the homeostasis evaluation and changes induced by pathological processes, hematological and biochemical alterations are used as damage biomarkers (Calado et al., 2015; LIMA, 2014).

### 3.2 Acute oral toxicity study

Oral administration of *C. ambrosioides* crude extract at a dose of 2000 mg/kg was not able to cause signs of morbidity and mortality in the population tested during the treatment. On the other hand, they cause an increase in AST and ALT levels in both males and females ( $p < 0.01$ ) without alter the creatinine levels. The results corroborate with a study carried out by da Silva et al. (2014), where values for AST and ALT were also elevated in 2000 mg/kg group when compared to the control group.

Regarding the hematological analyzes, when compared to the control, the treatment resulted in statistically significant changes in hematocrit, hemoglobin, CHCM, leukocytes, lymphocytes and platelets. These values are shown in Table 1. Although these markers have revealed statistical relevance, they are all within the normal physiological limits, which suggest an individual physiological variation of the tested individuals (Calil Brondani et al., 2017; LIMA, 2014).

**Table 1.** Hematological and biochemical parameters altered after the oral acute administration of *C. ambrosioides* L. 2000 mg/Kg in rats.

Parameters	Groups			
	Control		LEC 2000 mg/Kg	
	Male	Female	Male	Female
AST (U/L)	95.87 ± 6.41	107.77 ± 4.86	110.37 ± 3.48 <sup>a</sup>	131.40 ± 13.47 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	37.33 ± 2.33	56.33 ± 1.45	44.33 ± 2.40 <sup>a</sup>	45.00 ± 3.05
TCHOL (mg/dL)	67.66 ± 5.84	72.25 ± 1.31	79.66 ± 6.83 <sup>a</sup>	91.00 ± 4.94 <sup>a</sup>
HCT (%)	40.70 ± 0.49	45.50 ± 1.67	45.86 ± 0.26 <sup>a</sup>	45.03 ± 1.12
HBG (g/dL)	14.20 ± 0.36	14.53 ± 0.18	14.56 ± 0.12	13.93 ± 0.43 <sup>a</sup>
MCHC (g/dL)	31.73 ± 0.47	31.93 ± 0.78	31.70 ± 0.20	30.90 ± 0.17 <sup>a</sup>
PLT (x10 <sup>3</sup> /uL)	1144 ± 79.80	963.3 ± 40.17	996.3 ± 90.88 <sup>a</sup>	1214 ± 173.8 <sup>a</sup>
Leucocytes (%)	84.66 ± 6.88	79.50 ± 6.60	80.00 ± 3.21	94.00 ± 1.15 <sup>a</sup>
Lymphocytes (%)	68.25 ± 3.53	59.53 ± 8.06	63.98 ± 2.87	73.32 ± 0.90 <sup>a</sup>

Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments, performed in triplicate and t-test was applied. The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . <sup>(a)</sup> Different from the control.

The results obtained in the acute toxicity experiments of *C. ambrosioides* classified the extract as safe (category-5) according to the OECD 423, since all animals survived until the day of the euthanasia. Moreover, the extract is within category 5 with a LD<sub>50</sub> estimated in 2000 mg/kg.

### 3.3 Repeated dose oral toxicity study

Oral administration of the species crude extract at 50, 100 and 200 mg/kg doses for 28 days showed no adverse effects and mortality in treated animals. Considering that the hematological parameters show us the response presented by the organism to toxic compounds, once the blood is the main carrier of substances in the body, it is an important source for a toxicological evaluation (Calil Brondani et al., 2017). In relation to those

parameters (Table 2 and Table 3), it can be verified that even when presenting significant statistical differences when comparing the treated groups to the control group, it is possible to consider the samples safe in the tested doses, since they are within the normal homeostasis limit (LIMA, 2014).

**Table 2.** Erythrocyte parameters of rats after 28 days treatment with *C. ambrosioides* at doses of 50, 100 and 200 mg/kg.

Sex	Erythrocyte parameters	Groups			
		Control	50 mg/Kg	100 mg/Kg	200 mg/Kg
Male	HCT (%)	50.86 ± 2.41	48.34 ± 2.00	53.45 ± 2.15	50.80 ± 0.62
	RBC (x10 <sup>6</sup> /uL)	8.65 ± 0.51	8.23 ± 0.34	9.32 ± 0.37	8.72 ± 0.12
	HBG (g/dL)	15.64 ± 0.66	14.88 ± 0.74	16.20 ± 0.70	15.72 ± 0.14
	MVC (fL)	58.84 ± 0.94	58.76 ± 1.28	57.40 ± 0.00	58.34 ± 1.07
	MCHC (g/dL)	30.72 ± 0.40	30.74 ± 0.44	30.25 ± 0.05	30.92 ± 0.24
	PLT (x10 <sup>3</sup> /uL)	1066.4 ± 119.25	1063.8 ± 138.76	1068.5 ± 61.5	1051.2 ± 18.85
	RDW (%)	10.34 ± 0.20	10.36 ± 0.63	10.70 ± 0.20	10.80 ± 0.49
Female	HCT (%)	51.64 ± 0.60	50.8 ± 4.10	47.56 ± 1.89 <sup>a</sup>	50.55 ± 3.49
	RBC (x10 <sup>6</sup> /uL)	8.82 ± 0.11	8.91 ± 0.57	7.85 ± 0.86 <sup>a</sup>	8.48 ± 0.46
	HBG (g/dL)	14.78 ± 0.16	14.40 ± 1.05	12.42 ± 1.91 <sup>a</sup>	14.50 ± 1.01
	MVC (fL)	58.6 ± 1.01	56.34 ± 1.22 <sup>a</sup>	57.9 ± 1.79	59.65 ± 1.29
	MCHC (g/dL)	28.58 ± 0.20	28.64 ± 0.71	27.18 ± 1.48	28.62 ± 0.43
	PLT (x10 <sup>3</sup> /uL)	1185.2 ± 108.32	945.4 ± 315.75	1272.2 ± 442.11	1073 ± 123.56
	RDW (%)	9.94 ± 0.46	10.56 ± 0.38	10.60 ± 0.70	9.85 ± 0.51

Results are expressed as mean ± SD. T-test was applied and the values were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . <sup>(a)</sup> Difference compared to control.

**Table 3.** Leukocyte parameters of rats after 28 days treatment with *C. ambrosioides* at doses of 50, 100 and 200 mg/kg.

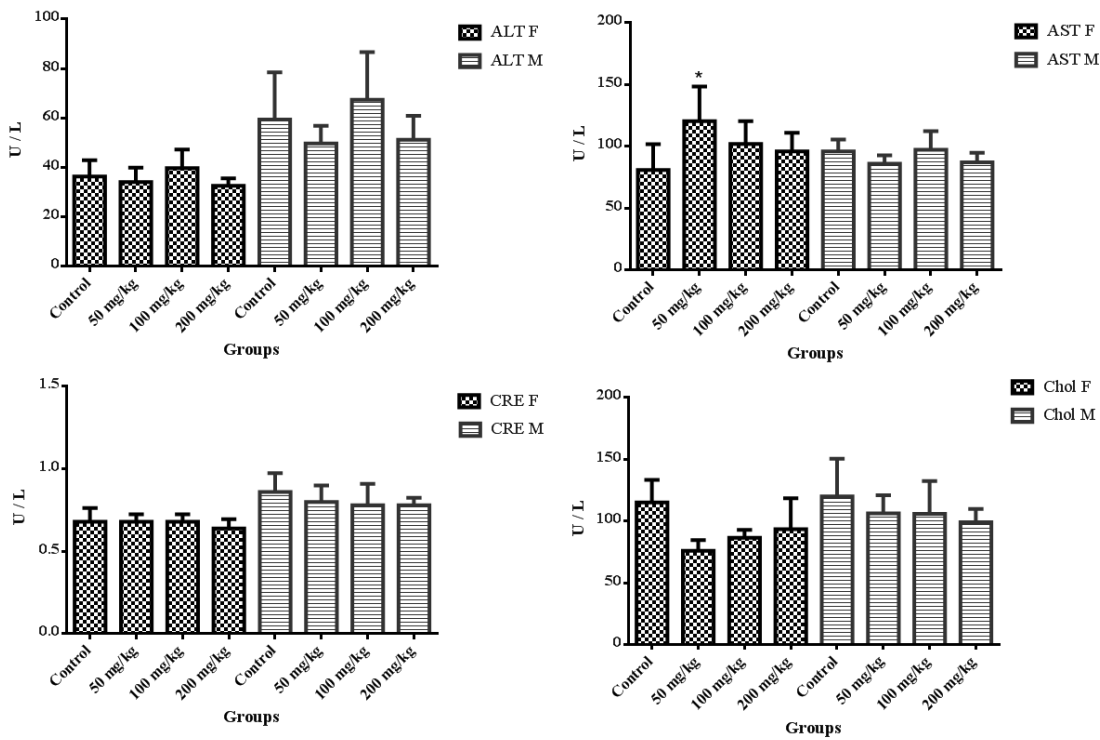
Sex	Leukocyte parameters	Groups			
		Control	50 mg/Kg	100 mg/Kg	200 mg/Kg
Male	Leucocytes (x10 <sup>3</sup> /uL)	4.10 ± 0.92	7.24 ± 1.52 <sup>a</sup>	9.40 ± 0.80 <sup>a</sup>	8.08 ± 1.04 <sup>a</sup>
	Neutrophils (%)	12.05 ± 2.49	12.27 ± 5.45	22.72 ± 3.80 <sup>a</sup>	18.58 ± 6.36
	Lymphocytes(%)	27.08 ± 7.99	56.67 ± 9.41 <sup>a</sup>	69.05 ± 5.41 <sup>a</sup>	59.07 ± 9.09 <sup>a</sup>
	Monocytes (%)	1.43 ± 1.21	1.83 ± 1.70	0.86 ± 0.86	2.24 ± 1.47
	Eosinophils (%)	0.44 ± 0.30	1.62 ± 1.10	0.94 ± 0.08	0.77 ± 0.64
	Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.28
Female	Leucocytes (x10 <sup>3</sup> /uL)	6.66 ± 1.52	5.42 ± 1.86	5.34 ± 1.17	3.60 ± 1.12 <sup>a</sup>
	Neutrophils (%)	12.16 ± 3.05	12.19 ± 2.68	12.38 ± 4.21	8.12 ± 2.89
	Lymphocytes(%)	51.66 ± 12.67	38.09 ± 15.75	38.24 ± 9.69	26.07 ± 8.12 <sup>a</sup>
	Monocytes (%)	1.88 ± 1.64	2.22 ± 2.15	2.02 ± 0.93	1.34 ± 1.10
	Eosinophils (%)	0.91 ± 0.67	1.41 ± 0.74	0.65 ± 0.26	0.48 ± 0.40
	Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.36	0.11 ± 0.22	0.00 ± 0.00

Results are expressed as mean ± SD. T-test was applied and the values were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . <sup>(a)</sup> Difference compared to control.

The biochemical parameters are also important to identify possible toxic effects in renal and hepatic tissues caused by the extract administration. The liver is the main organ responsible for drug metabolism, while AST and ALT are seric enzymes considered markers of hepatotoxicity and its increased activity indicates damage in this organ. Likewise, elevated levels of creatinine, urea and uric acid in the bloodstream indicates renal toxicity (Ramaiah, 2011).

Considering those evaluated parameters, it was observed that the females treated with 50 mg/kg showed an increase in AST enzyme activity. The values found for ALT and creatinine remained without significant differences, such as the biochemical analysis in males, which showed no variation (Figure 2).

When comparing the results obtained between the sexes, for example, the increase of AST in females treated with 50 mg/kg, it can be affirmed that the differences found are justified by the effects of estradiol in different metabolic pathways. Studies have shown that sex hormones can alter lipid and carbohydrate metabolism, and these alterations promote different biochemical responses (Calil Brondani et al., 2017; Pereira et al., 2016; Stanimirovic et al., 2016).



**Fig. 2.** Biochemical parameters after repeated doses treatment with *C. ambrosioides* (28 days). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA was applied, followed by Tukey e Dunns when appropriate. The differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (\*).

Lipid peroxidation is an indicator of oxidative damage to the cells in response to stress situations, once it destroys cell membranes. One of the biomarkers used to quantify oxidative stress is the malondialdehyde (MDA), which is a product of lipoperoxidation induced by free radicals (Sadaf et al., 2017).

Based on the previously described concept that the TBARS assay evaluates the concentration of malondialdehyde in the tested tissue, the results obtained in this study indicated an MDA increase in females treated with the dose of 50 mg/kg of *C. ambrosioides* extract (Figure 3). However, the hepatic tissue of the males and the renal tissue of both sexes did not present significant differences when compared to control.



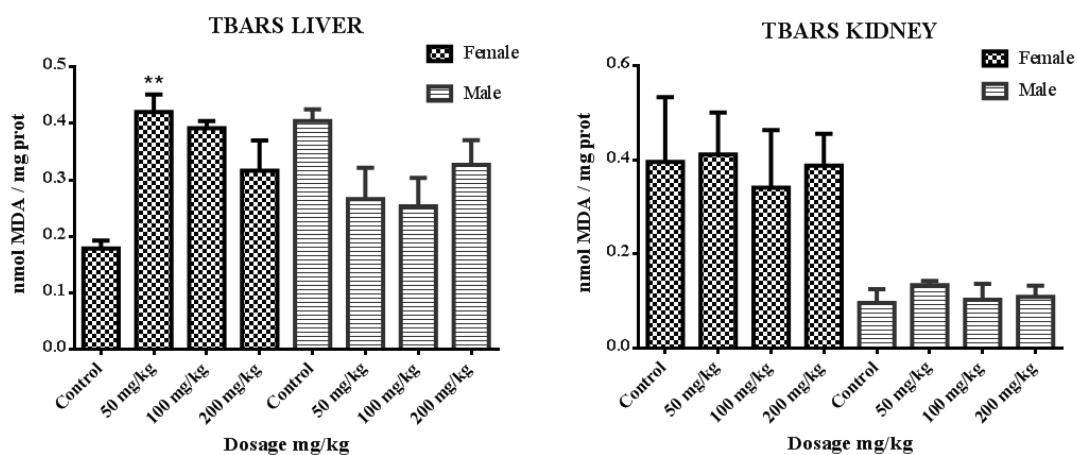


Fig.

3. Effects of repeated doses administration of *C. ambrosioides* (28 days) on the production of MDA. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA was applied followed by Tukey and Dunns when appropriate. The differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*)

We supposed that this result does not suggest toxicity, considering that in the higher doses (100 and 200 mg/kg) there was no significant difference from the control group. In addition, such outcome may be related to the increase in AST at the same dose and in the same sex and may be justified by the hormonal variations related to the sex of the individuals (Stanimirovic et al., 2016).

### 3.4 Anti-inflammatory effect of *C. ambrosioides*

#### 3.4.1 *C. ambrosioides* reduces croton oil-induced acute ear edema and MPO activity

The ear edema induced by the topical application of croton oil has been employed as a model to verify potential anti-inflammatory effects of plants crude extracts (into solutions or incorporated into semisolid dosage forms) (Camponogara et al., 2019c; Milani et al., 2019). Croton oil topical application increased the mice ear thickness ( $E_{\max} = 111 \mu\text{m}$ ), evaluated at 6h after its administration (time of the higher edematogenic effect of the irritant agent), when compared to the naïve group (did not receive croton oil application neither topical treatments) and vehicle (acetone topical administration). The LEC (0.01-1mg/ear) and *B. serrata* (1 mg/ear; positive control) were statistically effective in reducing croton oil-induced ear edema with an inhibitory dose 50% ( $ID_{50}$ ) of 0.13 (0.062 – 0.29) mg/ear. Moreover, it is noteworthy that LEC at 1 mg/ear presented similar antiedematogenic efficacy to that showed by the evaluated positive control ( $I_{\max} = 47.18 \pm 4.59\%$  e  $34.23 \pm 4.78\%$ , respectively (Figure 1).

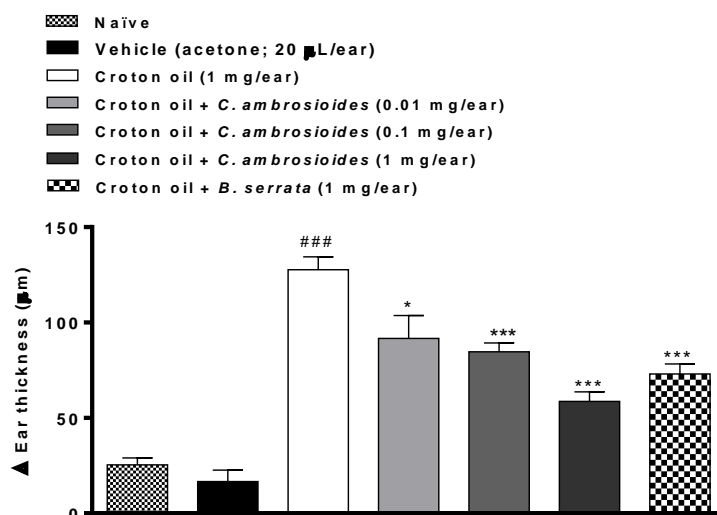
Acute inflammatory responses comprehend some aspects which include alterations in local hemodynamics, vascular permeability (edema formation) and inflammatory cells infiltration (Adami et al., 2012). The ear edema is a very common inflammatory parameter evaluated in skin inflammation models induced by different irritant agents since promote conditions that resemble some types of dermatitis observed in humans (Calado et al., 2015)(Silva et al., 2015). Besides, it is a useful experimental tool for the screening of compounds with potential topical and systemic anti-inflammatory activity, including plant extracts (de Brum et al., 2016; Piana et al., 2017).

Croton oil contains 12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetate (TPA) and other phorbol esters as main irritant agents, and its topical application on mice skin results in inflammatory responses involving the production/release of inflammatory mediators, edema formation and intense inflammatory cells infiltration (Camponogara et al., 2019a). This irritant agent exerts its effect through activation of protein kinase C (PKC) and inflammatory pathways and expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) enzymes, culminating with inflammatory mediators release responsible for triggering and maintaining inflammation (Otuki et al., 2011).

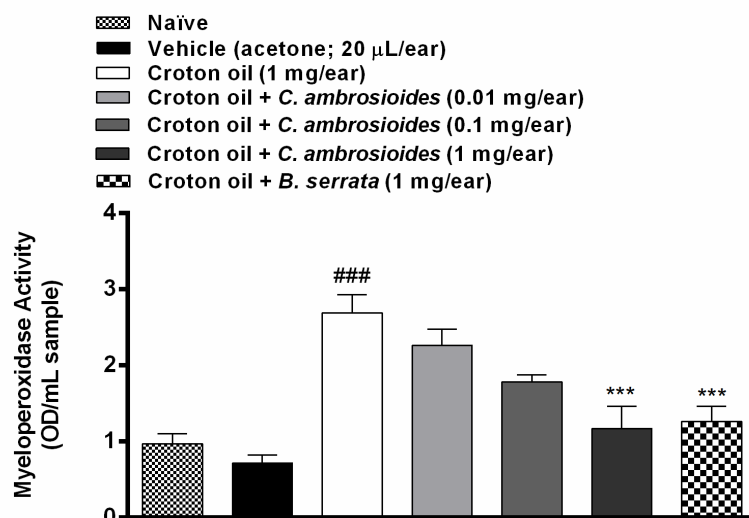
To complete the investigation about the topical anti-inflammatory effect of LEC, we further investigate the influence of topical treatment with LEC on inflammatory cells infiltration in the skin, another important feature of croton oil inflammatory model. In general, neutrophils are the first cells recruited from peripheral blood to inflammatory sites and contribute in the initiation and amplification of various inflammatory diseases, including in the cutaneous inflammatory process (Campanini et al., 2013; Park et al., 2016; Riol-Blanco et al., 2014). Infiltrated neutrophils produce and release myeloperoxidase (MPO), an enzymatic biomarker of inflammation, which reflects the degree of cutaneous inflammation (Khan et al., 2012). Moreover, the MPO activity inhibition by plant extracts is an indicative of anti-inflammatory action (Camponogara et al., 2019b; Silva et al., 2015; de Brum et al., 2016; Piana et al., 2013).

In this perspective, we observed that croton oil topical application increased the MPO activity to the mice ear damaged tissue, when compared to naïve and vehicle groups. The LEC at 1.0 mg/ear effectively reduced the MPO activity when compared with croton oil group with  $I_{max}$  of  $40.71 \pm 14.71\%$ . Similarly, the positive control *B. serrata* at 1.0 mg/ear also reduced the MPO activity by  $35.93 \pm 9.97\%$  (Figure 2).

LEC (dissolved in acetone) demonstrated effective topical anti-inflammatory activity against the irritant agent application, confirming its folk medicine use and indicating a possible application as an herbal medicine to treat skin inflammatory disorders in humans. However, further studies about the mechanisms by which LEC exerts its anti-inflammatory effect should be investigated since several inflammatory pathways are involved the croton oil-induced skin inflammation.



**Fig. 4.** Antiedematogenic effect of *C. ambrosioides* (0.01-1 mg/ear) and *B. serrata* (1 mg/ear) in a skin inflammation model induced by the topical administration of croton oil. Ear edema was measured 6h after croton oil administration. Each bar represents the mean + SEM (n=8); ###P < 0.001 shows significant difference when compared to the naïve or vehicle groups. \*P<0.05 e \*\*\*P<0.001 show significant difference when compared to the croton oil group. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc.



**Fig. 5.** Anti-inflammatory effect of *C. ambrosioides* (0.01-1 mg/ear) and *B. serrata* (1 mg/ear) topically applied on MPO activity of mice ear samples after croton oil-induced acute skin inflammation. MPO activity was measured 6 h after croton oil and treatments administration. Each bar represents the mean + SEM (n=8); ###P < 0.001 shows significant difference when compared to the naïve or vehicle groups. \*\*\*P < 0.001 shows significant difference when compared to the croton oil group. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc.

The chemical constitution of *C. ambrosioides* justified its pharmacological applications for inflammatory disorders. For example, quercetin is a secondary metabolite, member of the flavonoid class, widely distributed among a variety of plants, it presents itself free or as a glycoside, such as quercetin-3-glucoside and rutinoid. These compounds are known for their anti-inflammatory potential, antioxidant agents and other therapeutic properties (Pereira et al., 2016; Ribeiro et al., 2018).

Several studies reported that kaempferol and its derivatives (compounds we identified in *C. ambrosioides*) have anti-inflammatory properties (Devi et al., 2015), with potent inhibitory effects on the expression of enzymes such as COX-1, COX-2 and LOX in cell and cell-free assays. It is also reported that they can prevent NO production induced by LPS in RAW 264.7 cells, suppressing, that way, an inflammatory response (Ricciotti e FitzGerald, 2011).

*P*-coumaric acid compound identified in LEC is a phenolic acid present in vegetable species. Its structure is similar to gallic, caffeic and syringic acids, known for their important antioxidant potential (Lende et al., 2011). Ferulic acid acid was studied for its photochemopreventive effects against chronic ultraviolet-B induced oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the skin of Swiss albino mice. These results indicate that

ferulic acid has potential against UVB-induced carcinogenesis in the Swiss albino mice (Ambothi et al., 2015).

#### 4 Conclusion

Safety in acute and repeated doses in oral administration of *Chenopodium ambrosioides* L. lyophilized extract was tested in *Wistar* rats and showed a safety profile at maximum tested dose (category 5 according to OECD) since no signs of morbidity or mortality were recorded in the present experimental model. This result provides the understanding about safe doses of this species, which is widely used by people and allow pharmacological tests be carried out to justify its folk medicine use. In this sense, we demonstrated that *C. ambrosioides* lyophilized extract reduced all inflammatory parameters observed from croton oil-induced skin inflammation model in mice, indicating *C. ambrosioides* as a safe and effective potential alternative to treat skin inflammatory disorders.

#### Acknowledgements

The financial support provided by CAPES.

#### References

- Adami, M., Prudente, A. da S., Mendes, D.A.G.B., Horinouchi, C.D. da S., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., 2012. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. *J. Dermatol. Sci.* 66, 127–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.02.015>
- Adegbola, P., Aderibigbe, I., Hammed, W., Omotayo, T., 2017. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease : a review 7, 19–32.
- Ahmad, A., Dempsey, S.K., Daneva, Z., Azam, M., Li, N., Li, P., Ritter, J.K., 2018. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19092605>
- Alitonou, G.A., Sessou, P., Tchobo, F.P., Noudogbessi, J.P., Avlessi, F., Ou, B.Y., Menut, C., Villeneuve, P., Sohounhloue, D.C.K., 2012. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. *Int. J. Biosci.* 2, 58–66.
- Ambothi, K., Prasad, N.R., Balupillai, A., 2015. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.* 82, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.031>
- Anand, R., Kaithwas, G., 2014. Anti-inflammatory Potential of Alpha-Linolenic Acid Mediated Through Selective COX Inhibition : Computational and Experimental Data.  
<https://doi.org/10.1007/s10753-014-9857-6>

- Baldi, A., Choudhary, N., 2013. In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of chenopodium album extract. *Int. J. Green Pharm.* 7, 50. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.111614>
- Barbosa, M., Lopes, G., Ferreres, F., Andrade, P.B., Pereira, D.M., Gil-Izquierdo, Á., Valentão, P., 2017. Phlorotannin extracts from Fucales: Marine polyphenols as bioregulators engaged in inflammation-related mediators and enzymes. *Algal Res.* 28, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.009>
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Funct. Foods* 5, 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Benoît, M. a, D'Aprano, G., Lacroix, M., 2000. Effect of gamma-irradiation on phenylalanine ammonia-lyase activity, total phenolic content, and respiration of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 6312–6.
- Boller, S., Soldi, C., Marques, M.C.A., Santos, E.P., Cabrini, D.A., Pizzolatti, M.G., Zamprônio, A.R., Otuki, M.F., 2010. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 130, 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.001>
- Calado, G.P., Lopes, A.J.O., Junior, L.M.C., Das Chagas A. Lima, F., Silva, L.A., Pereira, W.S., Do Amaral, F.M.M., Garcia, J.B.S., Do Socorro De S. Cartágenes, M., Nascimento, F.R.F., 2015. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. *PLoS One* 10, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141886>
- Calil Brondani, J., Reginato, F.Z., da Silva Brum, E., de Souza Vencato, M., Lima Lhamas, C., Viana, C., da Rocha, M.I.U.M., de Freitas Bauermann, L., Manfron, M.P., 2017. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. *J. Ethnopharmacol.* 202, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.011>
- Campanini, M.Z., Pinho-Ribeiro, F.A., Ivan, A.L.M., Ferreira, V.S., Vilela, F.M.P., Vicentini, F.T.M.C., Martinezza, R.M., Zarpelon, A.C., Fonseca, M.J.V., Faria, T.J., Baracat, M.M., Verri, W.A., Georgetti, S.R., Casagrande, R., 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>
- Camponogara, C., Casoti, R., Brusco, I., Piana, M., Boligon, A.A., Cabrini, D.A., Trevisan, G., Ferreira, J., Silva, C.R., Oliveira, S.M., 2019a. *Tabernaemontana catharinensis* leaves effectively reduce the irritant contact dermatitis by glucocorticoid receptor-dependent pathway in mice. *Biomed. Pharmacother.* 109, 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.132>
- Camponogara, C., Casoti, R., Brusco, I., Piana, M., Boligon, A.A., Cabrini, D.A., Trevisan, G., Ferreira, J., Silva, C.R., Oliveira, S.M., 2019b. *Tabernaemontana catharinensis* leaves exhibit topical anti-inflammatory activity without causing toxicity. *J. Ethnopharmacol.* 231, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.021>
- Camponogara, C., Silva, C.R., Brusco, I., Piana, M., Faccin, H., de Carvalho, L.M., Schuch,

- A., Trevisan, G., Oliveira, S.M., 2019c. *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- $\kappa$ B pathways without causing toxicological effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 229, 190–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.011>
- Chakravarty B. and Sen S., 2001. *BioPlant* 54.pdf.
- Coelho, F.C., Tirloni, C.A.S., Marques, A.A.M., Gasparotto, F.M., Lívero, F.A. dos R., Gasparotto Junior, A., 2019. Traditional Plants Used by Remaining Healers from the Region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *J. Relig. Health* 58, 572–588. <https://doi.org/10.1007/s10943-018-0713-0>
- Costa, M.V.L., Tavares, E.S., 2006. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (*Chenopodiaceae*) - Erva-de-Santa Maria. *Rev. Bras. Plantas Med.* 8, 63–71.
- da Silva, M.G.C., Amorim, R.N.L., Câmara, C.C., Fontenele Neto, J.D., Soto-Blanco, B., 2014. Acute and Sub-Chronic Toxicity of Aqueous Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Leaves in Rats. *J. Med. Food* 17, 979–984. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0134>
- de Brum, T.F., Camponogara, C., da Silva Jesus, R., Belke, B.V., Piana, M., Boligon, A.A., Pires, F.B., Oliveira, S.M., da Rosa, M.B., de Freitas Bauermann, L., 2016. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. *J. Ethnopharmacol.* 193, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.075>
- Devi, K.P., Malar, D.S., Nabavi, S.F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S.M., Daglia, M., 2015. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol. Res.* 99, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>
- Graciliana Lopes, Carla Sousa, Luís R. Silva, Eugénia Pinto, Paula B. Andrade, João Bernardo, Teresa Mouga, P.V., 2012. Can Phlorotannins Purified Extracts Constitute a Novel Pharmacological Alternative for Microbial Infections with Associated Inflammatory Conditions? 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031145>
- Grassi, L.T., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., da Silva Buss, Z., Monguilhott, E.D., Fröde, T.S., da Silva, K.A.B.S., de Souza, M.M., 2013. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J. Ethnopharmacol.* 145, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.040>
- Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., Arici, M., Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., 2011. Effect of Gamma Irradiation on Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of *Satureja Hortensis*, *Thymus Vulgaris*, and *Thymbra Spicata* from Turkey CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES 2912. <https://doi.org/10.1080/10942910903453397>
- Hussain, P.R., Wani, A.M., Meena, R.S., Dar, M.A., 2010. Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus persica* Bausch, Cv. Elberta). *Radiat. Phys. Chem.* 79, 982–989. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.03.018>
- Ibironke, G.F.; Ajiboye, K.I., 2007. *ibironke 2007.pdf*.

- Ito, V.C., Alberti, A., Avila, S., Spoto, M., Nogueira, A., Wosiacki, G., 2016. Effects of gamma radiation on the phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of apple pomace flour during storage using multivariate statistical techniques. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.015>
- Jesus, R.S., Piana, M., Freitas, R.B., Brum, T.F., Alves, C.F.S., Belke, B. V., Mossmann, N.J., Cruz, R.C., Santos, R.C.V., Dalmolin, T. V., Bianchini, B. V., Campos, M.M.A., Bauermann, L. de F., 2018. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian J. Microbiol.* 49, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.012>
- Joshi, V., Umashankara, M., Ramakrishnan, C., Nanjaraj Urs, A.N., Suvilesh, K.N., Velmurugan, D., Rangappa, K.S., Vishwanath, B.S., 2016. Dimethyl ester of bilirubin exhibits anti-inflammatory activity through inhibition of secretory phospholipase A2, lipoxygenase and cyclooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 598, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.003>
- Khan, A., Alsahli, M., Rahmani, A., 2018. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med. Sci.* 6, 33. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>
- Khan, A.Q., Khan, R., Qamar, W., Lateef, A., Ali, F., Tahir, M., Muneeb-U-Rehman, Sultana, S., 2012. Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced NF- $\kappa$ B and COX-2 expression in mouse skin: Abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and proinflammatory cytokine production. *Food Chem. Toxicol.* 50, 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.10.043>
- KUMAR, R., MISHRA, A., DUBEY, N., TRIPATHI, Y., 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.017>
- Lende, A.B., Kshirsagar, A.D., Deshpande, A.D., Muley, M.M., Patil, R.R., Bafna, P.A., Naik, S.R., 2011. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. *Inflammopharmacology* 19, 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0086-4>
- Li, S., Tan, H., Wang, N., Zhang, Z., Lao, L., Wong, C., Feng, Y., 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- LIMA, C.M. et al., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe 8, 1–6.
- Loria, V., Dato, I., Graziani, F., Biasucci, L.M., 2008. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/135625>
- Mahir Kapl, H., Ok, F., Demir, E., 2017. Alpha-linolenic Acid Attenuates Lipopolysaccharide Induced Cystitis, *International Journal of Pharmacology.* <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.649.653>
- Mashima, R., Okuyama, T., 2015. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol.* 6, 297–310.



- Mello, J., Simões, C., Schenkel, E., Auler Mentz, L., Petrovick, P., 2017. Farmacognosia do produto natural ao medicamento.
- Meyer, O., 2003. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol. Lett.* 140–141, 21–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00492-7)
- Milani, G.B., Camponogara, C., Piana, M., Silva, C.R., Oliveira, S.M., 2019. Cariniana domestica fruit peels present topical anti-inflammatory efficacy in a mouse model of skin inflammation. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 392, 513–528. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1594-1>
- OECD, 2001. The Well-Being of Nations - The Role of Human and Social Capital. OECD Pap. 18. <https://doi.org/10.1111/1467-954X.00194>
- OECD Annual Report 2008, 2008. <https://doi.org/10.1787/annrep-2008-en>
- OMS, 2008. MINISTÉRIO DA SAÚDE ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE Brasília – DF 2008.
- Otuki, M.F., Bernardi, C.A., Prudente, A.S., Laskoski, K., Gomig, F., Horinouchi, C.D.S., Guimarães, C.L., Ferreira, J., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V., Cabrini, D.A., 2011. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 56–62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00689.x>
- Oufedjikh, H., Mahrouz, M., Amiot, M.J., Lacroix, M., 2000. Effect of  $\gamma$ -irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. *J. Agric. Food Chem.* 48, 559–565. <https://doi.org/10.1021/jf9902402>
- Park, S.H., Seo, W., Eun, H.S., Kim, S.Y., Jo, E., Kim, M.H., Choi, W.M., Lee, J.H., Shim, Y.R., Cui, C. hao, Kim, S.C., Hwang, C.Y., Jeong, W. Il, 2016. Protective effects of ginsenoside F2 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 1713–1719. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.009>
- Pereira, D.M., Correia-da-Silva, G., Valentão, P., Teixeira, N., Andrade, P.B., 2014. Anti-Inflammatory Effect of Unsaturated Fatty Acids and Ergosta-7,22-dien-3-ol from *Marthasterias glacialis*: Prevention of CHOP-Mediated ER-Stress and NF- $\kappa$ B Activation. *PLoS One* 9, e88341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088341>
- Pereira, D.M., Silva, T.C., Losada-Barreiro, S., Valentão, P., Paiva-Martins, F., Andrade, P.B., 2017. Toxicity of phenolipids: Protocatechuic acid alkyl esters trigger disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation in macrophages. *Chem. Phys. Lipids* 206, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.05.013>
- Pereira, E., Antonio, A.L., Barreira, J.C.M., Verde, S.C., Barros, L., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Evaluation of gamma-irradiated aromatic herbs: Chemometric study of samples submitted to extended storage periods. *Food Res. Int.* 111, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.051>
- Pereira, E., Barros, L., Dueñas, M., Antonio, A.L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Gamma irradiation improves the extractability of phenolic compounds in *Ginkgo biloba* L. *Ind. Crops Prod.* 74, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.039>

- Pereira, W.S., Ribeiro, B.P., Sousa, A.I.P., Serra, I.C.P.B., Mattar, N.S., Fortes, T.S., Reis, A.S., Silva, L.A., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., Nascimento, F.R.F., 2016. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 127, 602–605. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.018>
- Piana, M., Camponogara, C., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., 2017. *Solanum paranense* Extracts and Solanine Present Anti-Inflammatory Activity in an Acute Skin Inflammation Model in Mice. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2017, V. <https://doi.org/10.1155/2017/4295680>
- Piana, M., Silva, M.A., Trevisan, G., De Brum, T.F., Silva, C.R., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., Zadra, M., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Tonello, R., Laporta, L.V., De Freitas, R.B., Belke, B.V., Da Silva Jesus, R., Ferreira, J., Athayde, M.L., 2013. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *J. Ethnopharmacol.* 150, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.040>
- Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical Safety Assessment: Current Gaps, Challenges, and Approaches in Identifying Translatable Biomarkers of Drug-Induced Liver Injury. *Clin. Lab. Med.* 31, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.004>
- Randall, R.J., Lewis, A., [s.d.]. *The folin by oliver*.
- Reitera Elke; Jiangb Qing and Christena Stephan, 2009. *NIH Public Access* 28, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.01.003>.Anti-inflammatory
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Sanchez, V., Vázquez-Martínez, J., López, M.G., 2019. Antioxidant, intestinal immune status and anti-inflammatory potential of *Chenopodium ambrosioides* L. in fish: In vitro and in vivo studies. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.059>
- Ribeiro, V.P., Arruda, C., El-Salam, M.A., Bastos, J.K., 2018. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. *Pharm. Biol.* 56, 253–268. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1454480>
- Ricciotti, E., FitzGerald, 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Art Thromb Vas Biol* 31, 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.Prostaglandins
- Riol-Blanco, L., Ordovas-Montanes, J., Perro, M., Naval, E., Thiriot, A., Alvarez, D., Paust, S., Wood, J.N., Von Andrian, U.H., 2014. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature* 510, 157–161. <https://doi.org/10.1038/nature13199>
- Roth, S.H., 2012. Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs* 72, 873–879. <https://doi.org/10.2165/11633740-000000000-00000>
- S., P., 2011. Toxicological screening. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 4, 275–286. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(84\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0273-2300(84)90027-8)
- Sadaf, S., Emad, S., Siddiqui, N.A., Ghafoor, S., Yousuf, S., Jabeen, B., Haider, S., Perveen, T., 2017. Enhancement of memory function by antioxidant potential of *Nigella sativa* L. oil in restrained rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30, 2039–2046.
- Sadat-Hosseini, M., Farajpour, M., Boroomand, N., Solaimani-Sardou, F., 2017. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants in the south of Kerman, Iran. *J. Ethnopharmacol.* 199, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.006>

- Santos, M. et al., 2018. Effect of freezing and atomization on bioactive compounds in cagaita ( *Eugenia dysenterica* DC ) fruit 2061, 3–8.
- Sharma et al., 2007. Effect of Insulin and its Combination with Resveratrol or Curcumin in Attenuation of Diabetic Neuropathic Pain: Participation of Nitric Oxide and TNF-alpha Sameer. *Phyther. Res.* 21, 278–283. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Siddiqui, M.Z., 2011. *Boswellia serrata*, a potential antiinflammatory agent: an overview. *Indian J. Pharm. Sci.* 73, 255–61. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.93507>
- Silva, J.M., Conegundes, J.L.M., Mendes, R.D.F., Pinto, N.D.C.C., Gualberto, A.C.M., Ribeiro, A., Gameiro, J., De Aguiar, J.A.K., Castanon, M.C.M.N., Scio, E., 2015. Topical application of the hexane fraction of *Lacistema pubescens* reduces skin inflammation and cytokine production in animal model. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 1613–1622. <https://doi.org/10.1111/jphp.12463>
- Silva, T.C., de Andrade, P.B., Paiva-Martins, F., Valentão, P., Pereira, D.M., 2017. In vitro anti-inflammatory and cytotoxic effects of aqueous extracts from the edible sea anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030653>
- Simpson, B.S., Luo, X., Wang, J., Song, Y., Claudie, D.J., Garg, S., Smith, N.M., McKinnon, R.A., Semple, S.J., 2015. Development and evaluation of a topical anti-inflammatory preparation containing *Dodonaea polyandra* extract. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 18, 578–599. <https://doi.org/10.18433/J38P57>
- Song, H.Y., Kim, H.M., Kim, W.S., Byun, E.H., Jang, B.S., Choi, D.S., Byun, E.B., 2018. Effect of gamma irradiation on the anti-oxidant and anti-melanogenic activity of black ginseng extract in B16F10 melanoma cells. *Radiat. Phys. Chem.* 149, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.03.008>
- Song, K., Zhang, J., Zhang, P., Wang, H.-Q., Liu, C., Li, B.-M., Kang, J., Chen, R.-Y., 2015. Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 17, 482–490. <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1042872>
- Stanimirovic, J., Obradovic, M., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., Pitt, S.J., Stewart, A.J., Isenovic, E.R., 2016. A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 54, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.007>
- Stewart, E.M., 2001. STEWART, E. M. radiation Princ. Appl. 37–76.
- Taghipour, F., 2004. Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. *Water Res.* 38, 3940–3948. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.016>
- Thiombiano, A.M.E., Adama, H., Jean, B.M., Bayala, B., Nabère, O., Samson, G., Roland, M.N., Moussa, C., Martin, K., Jeanne, M.F., Germaine, N.O., 2014. In vitro Antioxidant , Lipoxigenase and Xanthine Oxidase inhibitory activity of fractions and macerate from *Pandiaka angustifolia* ( vahl ) Hepper 4, 9–13. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40102>
- Trivellatograssi, L., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., Da Silva Buss, Z., Monguilhott, E.D., Fröde, T.S., Da Silva, K.A.B.S., De Souza, M.M., 2013. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J. Ethnopharmacol.* 145, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.040>

- Vardhan, P.V., Shukla, L.I., 2017. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 967–979. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1344788>
- Vidal, P.J., López-nicolás, J.M., Gandía-herrero, F., García-carmona, F., 2014. Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *FOOD Chem.* 154, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.014>
- WHO, 1999. WHO monographs on selected medicinal plants 1.
- Xiao, X., Xie, H., Jian, D., Deng, Y., Chen, X., Li, J., 2015. Rebounding triad (severe itching, dryness and burning) after facial corticosteroid discontinuation defines a specific class of corticosteroid-dependent dermatitis. *J. Dermatol.* 42, 697–702. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12877>
- Yang, R., Yuan, B., Ma, Y., Zhou, S., Liu, Y., 2016. The anti-inflammatory activity of licorice , a widely used Chinese herb. *Pharm. Biol.* 0, 000. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1225775>
- Zipp, F., Aktas, O., 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 29, 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.006>





#### 4 DISCUSSÃO GERAL

A utilização de plantas na medicina popular é uma prática muito antiga, proveniente do conhecimento empírico da população, onde informações a respeito dos benefícios das plantas medicinais são passados de geração a geração. Tal prática ocorre devido a biodiversidade, a infinidade de espécies vegetais com potencial farmacológico fundamenta seu uso no tratamento de uma gama de enfermidades (WHO, 2014).

O Brasil é um dos países com a maior flora, com mais de 45.000 espécies vegetais representa 20-22% da biodiversidade mundial. No entanto, quando se compara o número de espécies vegetais de potencial farmacológico conhecido com produtos acabados derivados dessas espécies, percebe-se a necessidade do incentivo a pesquisa científica com a flora brasileira (DUTRA et al., 2016). Desse modo, em 2009 o Ministério da Saúde do Brasil criou a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS (RENISUS), o qual se trata de uma listagem de 71 espécies vegetais amplamente utilizadas pela população brasileira, e que por isso merecem incentivo a pesquisa científica quanto a sua eficácia e segurança (BRASIL, 2009).

Ao iniciar o estudo com plantas medicinais, é fundamental identificar a espécie a qual se pretende estudar e realizar sua caracterização fitoquímica. Com isso, é possível identificar os metabólitos secundários e conseqüentemente os compostos bioativos presentes na amostra (SIMÕES et al., 2017). No presente trabalho a caracterização fitoquímica de *C. ambrosioides* foi realizada num primeiro momento com as seguintes amostras liofilizadas: extrato não irradiado, extrato irradiado e extrato da planta irradiada. As amostras foram submetidas a radiação na dose de 1kGy, dose de referência para conservação de amostras frescas e para fins de padronização (MOLLINS, 2001). Assim, a comparação fitoquímica apontou a perspectiva de identificar possíveis alterações ocasionadas pela radiação gama na espécie. Também foi avaliado se uma ocasional diferença na concentração de metabólitos presentes nas amostras, poderia interferir no potencial farmacológico das mesmas.

Utilizando o sistema de CLAE-DAD, foram identificados importantes fitocompostos com potencial farmacológico conhecido, todas as amostras apresentaram a mesma constituição química, de modo qualitativo. No entanto, diferenças nas concentrações dos compostos foram identificadas. De modo geral, o teor de polifenóis variou de 12,53 a 3,98 µg/mg no extrato seco, sendo o extrato da planta irradiada o com maior concentração e o

extrato irradiado o de menor concentração de compostos fenólicos, o extrato não irradiado por sua vez apresentou uma concentração intermediária referente a 8,5 µg/mg.

Ao analisar um extrato vegetal submetido a radiação, é importante levar em conta que a possível modificação na composição química da amostra pode acontecer por mecanismos complexos, que podem resultar em aumento, redução e até mesmo inativação de metabólitos secundários (VARDHRAN et al., 2017). Como não há atividade enzimática em um extrato seco, tais alterações podem ser resultado da degradação ou biotransformação de compostos presentes no extrato. Altas doses de radiação nem sempre ocasionam um aumento na concentração fitoquímica, é importante otimizar as doses e realizar a comparação entre extratos irradiados e não irradiados para definir os melhores resultados (PEREIRA et al., 2017).

Nas amostras analisadas foram identificados compostos fenólicos, tais como ácido protocatéquico, derivados de quercetina, derivados de canferol, canferol diraminósido-*O*-hexósido, quercetina-3-*O*-rutinósido, canferol-*O*-pentosyl-rhamnosyl-hexosido, quercetina-3-*O*-glucosido e derivados do ácido *p*-cumárico. A análise química do extrato não-irradiado também foi realizada por espectrometria de massas, esse sistema evidenciou alguns compostos diferentes dos encontrados por CLAE-DAD, tais como: 6-hidroxycumarin, ácido ferúlico e quercitrin.

O extrato da planta viva irradiada se destacou pelo aumento considerável de alguns de seus constituintes, apresentou uma concentração 40 vezes maior de derivados de canferol e quercetina-3-*O*-rutinósido, quando comparado aos demais extratos. O extrato irradiado por sua vez, apontou uma diminuição significativa, cerca de 25 vezes, na concentração do canferol-3-*O*-rutinósido ao comparar com o ENI e o EPI. As diferenças encontradas na análise de CLAE-DAD já eram esperadas no extrato da planta submetida a radiação prévia, estudos demonstram a influência da radiação gama na concentração fitoquímica de amostras vegetais irradiadas, principalmente nos compostos fenólicos. As publicações atribuem o aumento na concentração desses compostos pela ação da radiação na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase a qual é precursora dos fenilpropanóides (PEREIRA et al., 2015).

Em estudo realizado por Pereira e colaboradores (2015) utilizando extratos de *Ginkgo biloba*, os autores demonstraram que a radiação na dose de 10kGy foi suficiente para garantir a inativação microbiana e o aumento na extração de compostos fenólicos dos extratos quando comparados as amostras não irradiadas. A resposta dos produtos naturais a radiação é muito variável, estudos apresentam que a bioatividade de amostras irradiadas aumenta em resposta a esse estímulo externo. Pêssegos irradiados na faixa de dose 1,6 - 2,0 kGy, tiveram seu



potencial antioxidante potencializado, os autores atribuem o aumento na bioatividade a potencialização de polifenóis ocasionada pela radiação. Irradiação gama de tâmaras a 2,5 kGy aumentou a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total. Em resumo, a irradiação gama (2,5 kGy) aumentou o conteúdo fenólico total, assim como aumentou a atividade de eliminação de radicais livres. (GHADI, 2015)

Como a enzima PAL está relacionada a biossíntese de flavonoides, alguns estudos comparam a atividade enzimática dos produtos submetidos a radiação. De acordo com Benoit e colaboradores (2000) cogumelos submetidos a radiação na dose de 2,5kGy apresentaram aumento de 4 vezes, quando comparados a amostras não-irradiadas.

Em contrapartida, algumas publicações documentam que o aumento na composição de compostos fenólicos de um produto natural submetido a radiação, nem sempre promove uma melhora na bioatividade. Especiarias conhecidas por seu potencial antioxidante (*Thymus vulgaris* e *Thymbra spicata*) irradiadas na dose de 1- 5kGy apresentaram diminuição na capacidade de eliminação do radical DPPH após a irradiação (GUMUS et al., 2011). Esse contexto sugere que as espécies vegetais possuem comportamento diferente quando submetidos a radiação ionizante. A amostra deve ser selecionada, as doses de radiação devem ser padronizadas e otimizadas com a finalidade de avaliar se há o aumento nos compostos fenólicos, e se promove uma melhor bioatividade.

Devido a utilização popular de *C. ambrosioides* e sua inserção no RENISUS, é fundamental a realização de estudos pré-clínicos com a referida espécie, com a finalidade de justificar e promover a segurança em seu uso. Desse modo a bioatividade foi avaliada primeiramente na elucidação de seus possíveis mecanismos anti-inflamatórios, já que grande parte das doenças tais como: asma, artrite reumatoide, aterosclerose e até mesmo o câncer são causadas por distúrbios inflamatórios (BENAVENTE-GARCÍA e CASTILLO, 2008; YUNES e CECHINEL, 2016).

Tendo em vista a cascata do ácido araquidônico nos processos inflamatórios, vê-se duas vias distintas relacionadas a inflamação: a via das cicloxigenases COX-1 e COX-2 sendo a primeira constitutiva e a segunda indutível e a via da lipoxigenase 5-LOX. Os AINES atuais podem ser não seletivos inibindo a COX-1 e COX-2, os quais se caracterizam por causar efeitos adversos gastrointestinais e seletivos denominados COXIBES inibindo apenas a COX-2. No ano de 2004 grande parte dos COXIBES o qual se destacava pela ausência de efeitos adversos gastrointestinais foram retirados do mercado, pois seu uso prolongado apresentou cardiopatias nos pacientes tratados com esses fármacos.

O metabolismo do AA pela 5-LOX resulta na produção dos ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs), que por sua vez são convertidos a derivados hidroxilados (HETES) e leucotrienos. Os leucotrienos produzidos pela LOX presentes em células envolvidas nos processos inflamatórios, tem despertado grande interesse científico já que está associada a doenças cardiovasculares, choque anafilático e asma (KATZUNG; MASTERS E TREVOR, 2014). Produtos naturais derivados de plantas medicinais com ação anti-inflamatória são considerados uma importante fonte para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (RIBEIRO et al., 2018)

Com a finalidade de identificar mecanismos de ação envolvidos no possível potencial anti-inflamatório de *C. ambrosioides* a inibição da LOX foi avaliada, todas as amostras testadas apresentaram valor semelhante para esse ensaio apresentando um IC<sub>50</sub> que variou de 0,400 a 0,488mg/mL. Tal resultado não apresentou diferença significativa quando comparado extratos submetidos ou não a radiação gama, mesmo o aumento considerado de compostos fenólicos no EPI não foi capaz de potencializar a atividade inibitória da LOX.

O óxido nítrico é derivado da óxido nítrico sintase reduzida (iNOS), a qual está presente em várias patologias causando dano tecidual e promovendo os processos inflamatórios e as doenças autoimunes (SINGH et al., 2015). Desse modo, um potencial ação anti-inflamatório está ligado a supressão dessa enzima (AHMAD et al., 2018). No estudo do potencial de captura do <sup>•</sup>ON dos extratos de *C. ambrosioides* foi avaliado. O ENI foi o que apresentou melhor potencial IC<sub>50</sub> de 0,431mg/mL, seguido pelo EI com IC<sub>50</sub> de 0,773mg/mL, já o EPI apresentou a menor atividade apresentando um IC<sub>50</sub> >1000 mg/mL.

Para verificar o potencial anti-inflamatório *in vitro* de extratos de *C. ambrosioides* também foram utilizadas técnicas de cultura celular, com células da linhagem RAW 264,7. Assim, foi verificada a viabilidade dessas células submetidas a diferentes concentrações de extratos da planta, através do método de MTT como ensaio preliminar. Tal teste possui o intuito de verificar uma concentração segura da amostra a ser utilizada nos ensaios com cultura celular, ou seja, que não comprometam a viabilidade das células (SILVA et al., 2017).

As amostras testadas não apresentaram citotoxicidade até a concentração de 0,250mg/mL, porém todos os extratos apresentaram diferenças significativas nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL. O IC<sub>50</sub> foi calculado para avaliar a concentração capaz de afetar a viabilidade celular em 50%, o EPI e ENI evidenciaram um IC<sub>50</sub> semelhante, valores de 0,791 e 0,787 mg/mL respectivamente. Para o EI foi calculado o IC<sub>25</sub> pois não foi capaz de afetar 50% da viabilidade celular, onde o valor encontrado de IC<sub>25</sub> foi de 0,795 mg/mL. Os

resultados obtidos nesse ensaio direcionaram concentrações consideradas seguras dos extratos de *C. ambrosioides* para a análise do potencial de redução dos níveis de óxido nítrico em macrófagos (RAW 264,7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS).

O óxido nítrico é uma molécula sinalizadora que possui um importante papel na patogênese da inflamação, em condições normais é um agente vasodilatador e neurotransmissor. Em condições anormais pode agir como pró-inflamatório e pode estar envolvido na produção de lesões oxidativas em proteínas (AHMAD et al., 2018). Os extratos foram capazes de promover uma redução do ON em meio celular. Porém o extrato mais efetivo foi o ENI apresentando  $IC_{50}$  0,201 mg/mL quando comparado as demais amostras EI e EPI com  $IC_{50} > 0,250$  mg/mL.

O interesse pela identificação do potencial farmacológico de extratos vegetais, tem causado o aumento no número de pesquisas principalmente com as espécies vegetais amplamente utilizadas na medicina popular. Além da comprovação da bioatividade, que parte de estudos *in vitro* para *in vivo*, ensaios referentes a segurança das plantas medicinais merecem destaque. A grande maioria das espécies vegetais ainda são utilizadas de modo indiscriminado pela população, o que norteia a realização de estudos translacionais que partam de resultados obtidos na análise *in vitro*. Tendo em vista os resultados apresentados no primeiro capítulo do presente trabalho, o ENI de *C. ambrosioides* foi a amostra com melhores resultados ao comparar sua bioatividade com amostras submetidas a radiação gama. Tal fato, direciona que o aumento dos compostos fenólicos por si só, não foi capaz de melhorar a atividade anti-inflamatória da planta para as análises realizadas.

Tal aumento não foi capaz de gerar um maior efeito quando comparado ao extrato não irradiado, o que leva a crer que o processo de radiação pode ter degradado compostos responsáveis pela ação farmacológica. Por exemplo, compostos mais apolares como terpenos e ácidos graxos são mais sensíveis a radiação, de qualquer forma o extrato não-irradiado apresentou melhores resultados o que direcionou a continuação de estudos com essa amostra.

No que tange a toxicidade aguda após a administração de 2000mg/Kg do extrato bruto de *C. ambrosioides* L. em ratos Wistar machos e fêmeas, de acordo com a OCDE 423, uma vez que todos os animais sobreviveram até sua eutanásia, o extrato não apresentou toxicidade e foi incluído na categoria 5, com  $LD_{50}$  estimado entre 2000-5000 mg / kg. as alterações fisiológicas no comportamento, olhos, pele e atividade somatomotor não foram observadas e todos os animais sobreviveram durante o período de tratamento, nenhuma morte foi registrada.

Pode-se afirmar também que a planta não alterou significativamente os parâmetros hematológicos nos grupos testados quando comparado aos grupos controle de ambos os sexos, porém foram identificadas diferenças significativas na ALT diminuiu no grupo teste (2000 mg/kg) em relação ao grupo controle. Por se tratar de tratamento a curto prazo com a referida espécie vegetal, pode-se sugerir que tais alterações somente nas fêmeas possuem relação com a diferença hormonal entre fêmeas e machos. Por fim, a inexistência de sinais de morbidade e mortalidade sugere segurança relativa da planta, quando administrada a curto prazo (BAFOR e IGBINUWEN, 2009).

A administração oral por doses repetidas (50, 100 e 200 mg/Kg) durante 28 dias não foi capaz de promover a mortalidade dos animais nem de gerar efeitos adversos, os parâmetros hematológicos se apresentaram dentro do limite de homeostase (LIMA et al., 2014). A segurança de *C. ambrosioides* L. já havia sido documentada Pereira et al., (2010), o extrato hidroalcoólico das folhas da espécie nas concentrações de 5-500mg/Kg administrada em ratos Swiss não promoveu letalidade nem toxicidade. A infusão da espécie também não foi tóxica nas doses administradas de 32, 64 e 134mg/mL em ratos Swiss, não houve alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos nos animais testados (MENDONZA et al., 2013).

A enzima AST apresentou um aumento nos tratamentos de 50 e 100mg/Kg. No entanto, os valores para ALT e creatinina permaneceram inalterados. Do mesmo modo esses parâmetros não apresentaram alteração nos machos, o que leva a crer que as diferenças encontradas podem ser justificadas pelos efeitos do estradiol em diferentes vias metabólicas. Estudos demonstram que hormônios sexuais podem alterar o metabolismo lipídico e de carboidratos, e essas alterações promovem diferentes respostas bioquímicas (STANIMIROVIC et al., 2016; AFONSO-PEREIRA et al., 2016; BRONDANI et al., 2017).

A lipoperoxidação desempenha papel importante nos processos patológicos, partindo do conceito já descrito de que o ensaio TBARS avalia a concentração de malondialdeído no tecido testado, o qual, por sua vez, é produto da lipoperoxidação, os resultados obtidos neste estudo indicaram aumento de MDA no fígado das fêmeas, tratadas com a dose de 50 mg/Kg do extrato. No entanto, o tecido hepático dos machos e o renal de ambos os sexos não apresentaram diferença significativas quando comparados ao controle. Acreditamos que tal resultado não sugere uma toxicidade, já que nas doses mais elevadas (100 e 200 mg/Kg) não houve significância. Além disso, tal resultado pode ser relacionado ao aumento da AST na mesma dose e no mesmo sexo, podendo ser justificado tendo em vista as variações hormonais relacionadas ao sexo dos indivíduos.

Tendo em vista os resultados obtidos no primeiro capítulo do presente trabalho, onde os extratos de *C. ambrosioides* foram efetivos frente a LOX, os ensaios da atividade anti-inflamatória *in vivo* tiveram como controle positivo o extrato seco de *Boswellia serrata* conhecido por ser um anti-inflamatório natural, atua através da inibição da LOX.

O edema de orelha induzido pela administração tópica de óleo de cróton tem sido utilizado como um modelo para verificar potencial efeito anti-inflamatório tópico de extratos brutos de plantas (em soluções ou incorporados a formulações semissólidas) (MILANI ET AL., 2019; CAMPONOOGARA et al., 2019b). A aplicação tópica de óleo de cróton aumentou a espessura da orelha dos animais ( $E_{\text{máx}} = 102 \mu\text{m}$ ), avaliada em 6h após sua aplicação (tempo de maior efeito edematogênico do agente irritante), quando comparada ao grupo naïve (não recebeu a aplicação de óleo de cróton nem dos tratamentos) e veículo (aplicação tópica de acetona). Os extratos de *C. ambrosioides* (0,01-1mg/orelha) e *B. serrata* (1 mg/orelha; controle positivo) foram estatisticamente eficazes em reduzir o edema de orelha induzido pelo agente irritante. Além disso, vale ressaltar que o extrato de *C. ambrosioides* na dose de 1 mg/orelha apresentou eficácia antiedematogênica similar à do controle positivo testado ( $I_{\text{máx}} = 42,67 \pm 4,98\%$  e  $28,61 \pm 5,19\%$ , respectivamente).

A mieloperoxidase MPO é uma enzima que tem sua liberação no líquido extracelular após estresse oxidativo. Qualquer desequilíbrio pode gerar dano tecidual e potencializar a inflamação. O aumento do nível de atividade da MPO é considerada uma importante ferramenta de diagnóstico de biomarcadores de estresse inflamatório e oxidativo entre essas doenças comuns (KHAN, MOHAMED e RAHMANI, 2018).

Nesse contexto, o tratamento com o agente irritante óleo de cróton promoveu um aumento na infiltração neutrofílica para o tecido danificado da orelha dos camundongos quando comparado aos grupos naïve e veículo. O extrato bruto de *C. ambrosioides* na dose de 1,0 mg/orelha reduziu efetivamente a atividade da MPO quando comparado ao grupo óleo de cróton, com  $I_{\text{máx}}$  de  $31,93 \pm 16,89\%$ . Similarmente, o controle positivo avaliado, *B. serrata*, na dose de 1,0 mg/orelha reduziu a atividade da MPO com  $I_{\text{máx}}$  de  $26,44 \pm 11,45\%$ .

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que *C. ambrosioides* L. apresenta segurança e possui uma atividade anti-inflamatória potencial, a sua utilização na medicina popular como anti-inflamatório natural é justificada e a espécie mostra-se promissora no desenvolvimento de produtos farmacêuticos.



## 5 CONCLUSÃO

- O perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD e análise por massas indicaram a presença de compostos com potencial farmacológico conhecidos tais como: ácido *p*-cumárico, ácido protocatéuico, derivados de canferol, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, quercetina-3-glucósido, 6-hidroxicumárina e ácido ferúlico.
- O EPI foi a amostra que apresentou a maior concentração de compostos fenólicos (aumento cerca de 20 vezes), seguido pelo ENI e EI respectivamente, o que sugere que a radiação gama influencia na potencialização de compostos fenólicos quando há atividade enzimática de *C. ambrosioides* submetida a essa condição.
- Todas as amostras testadas foram capazes de inibir a LOX de modo concentração-dependente (IC<sub>50</sub> 0,400 – 0,488 mg/mL).
- O ENI apresentou o melhor potencial de captura de óxido nítrico IC<sub>50</sub> 0,431mg/mL quando comparado aos demais extratos.
- A viabilidade celular de RAW 264,7 não foi afetada em concentrações até 0,250mg/mL para todas as amostras testadas.
- O ENI apresentou o melhor potencial de redução do óxido nítrico em meio celular IC<sub>50</sub> 0,201mg/mL.
- Os resultados obtidos através das análises *in vitro* evidenciam a ação anti-inflamatória do ENI quando comparado aos submetidos a radiação, sendo a amostra mais bioativa para os ensaios realizados.
- Os animais tratados com o extrato de *C. ambrosioides* na dose única de 2000 mg/Kg, ou nas doses repetidas de 50, 100 e 200 mg/Kg, não apresentaram sinais de morbidade ou mortalidade para ambos os sexos testados.
- Tendo em vista o protocolo da OECD, o extrato pode ser classificado na categoria 5, onde a toxicidade aguda letal é maior que 2000 mg/Kg.
- Avaliando os parâmetros bioquímicos e hematológicos, pode-se afirmar que todos permaneceram dentro dos valores fisiológicos normais, após a administração do extrato da planta.
- Ao avaliar o efeito oxidativo após a administração prolongada do extrato, pode-se observar um aumento do MDA na dose de 50 mg/Kg, no entanto, quando comparado às concentrações mais altas (100 e 200 mg/Kg) esse efeito não ocorre, o que sugere a segurança nas respectivas doses testadas.

- Os extratos de *C. ambrosioides* (0,01-1mg/orelha) e *B. serrata* (1 mg/orelha; controle positivo) foram estatisticamente eficazes em reduzir o edema de orelha induzido pelo agente irritante. Além disso, vale ressaltar que o extrato de *C. ambrosioides* na dose de 1 mg/orelha apresentou eficácia antiedematogênica similar à do controle positivo testado.
- O extrato liofilizado de *C. ambrosioides* na dose de 1,0 mg/orelha reduziu efetivamente a atividade da MPO quando comparado ao grupo óleo de cróton.



## REFERENCIAS

- ADAMS, L. A.; ÂNGULO, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetic Medicine**. v 22, p 1129-1133, 2005.
- AFONSO-PEREIRA, F. Sex differences in excipient effects: Enhancement in ranitidine bioavailability in the presence of polyethylene glycol in male, but not female, rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 506, p. 237-241, 2016.
- AHMAD, A.; DEMPSEY, S. K.; DANEVA, ZDRAVKA, D.; AZAM, M.; LI, N.; LI, P.; RITTER, J. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.1-23, 2018.
- ANVISA. **Boletim informativo - Fitoterápicos**. Edição nº 64, p. 6-8, novembro de 2006.
- AOUIDI, F., AYARI, S., FERHI, H., ROUSSOS, S., HAMDI, M. Gamma irradiation of air-dried olive leaves: effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds. **Food Chemistry**. V.127, p.1105–1113, 2011.
- BAFOR, E. E.; IGBNUWEN, O. Acute toxicity studies of the leaf extract of *Ficus exasperata* on haematological parameters, body weight and body temperature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 302-307, 2009.
- BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. **Lab. Animals**. v. 28,p. 193-211, 1994.
- BARROS, L.; et al. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of functional foods**, v. 5, p. 1732-1740, 2013.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J Agric Food Chem**, v. 15, p. 6185-205, 2008.
- BIRBEN, B. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense-Review Article. **WAO Journal**, v.5, p.9-19, 2012.
- BLUMENTAHL, M. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicine. **American Botanical Council**: New York, 1998.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. 2009a. Disponível em:  
<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/05/programa-nacional-plantas-mediciniais-fitoter--picos-pnpmf.pdf>> Acesso em: abril. 2017.
- BRONDANI, J. C. et al. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 202, p. 147-153, 2017.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal peroxidation. *Methods in Enzymology*. v.52, p. 302-310, 1987.

CADEO, C.; SALES, O.D.; PONS, R.; BUSQUETS, X. F. Topical Anti-Inflammatory Potential of Quercetin in Lipid-Based Nanosystems: *in vivo* and *in vitro* Evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n.4, 2013.

CASTRO, D. L. L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: um enfoque qualitativo no Distrito Federal**. 2006. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2006.

CAZARIN, K.C. et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 40, n. 3, 2004.

CALADO, G.; LOPES, A.; COSTA, L. J.; LIMA, F. C.; SILVA, L.; PEREIRA, W.; AMARAL, F.; GARCIA, J.; CARTÁGENES, M.; NASCIMENTO, F.R. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. **Plos one**, v.2, p.1-18, 2015.

CAMPONOGARA, C. et al. *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- $\kappa$ B pathways without causing toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 190-204, 2019b.

CECHINEL, F. e YUNES, R. A. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. *Química de Produtos Naturais*, 5<sup>a</sup> ed. Vale do Itajaí, 2016.

CHAKRAVARTY, B.; SEN. S. BioPlant 54.pdf. **Biologia Plantarum**, 2001.

CHOI, S.; TAI, B.; CUONG, N. M.; KIM, Y.; JANG, H. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*). **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n.2. p. 587-595, 2012.

COELHO, F. C. et al. Traditional plants used by remaining healers from the region of grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Religion and Health**, published online, 2018.

COSTA, V.P.; MAYWORM, M.A.S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.282-292, 2011.

COSTA, M.V.L.; TAVARES, E.S. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) – Erva-de-santa-maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.63-71, 2006.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.400-409, 2012.

DEGENHARDT, R.T. et al. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n.56, p. 56-61, 2016.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A, CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.** v.65, n.4, p.337-353, 1999.

Directive 1999/3/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999 on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. **Off. J. Eur. Communities**, p. 24–25, 1999.

DUNNE, F. J. The ‘natural health service’: natural does not mean safe. **Advances in Psychiatric Treatment**, v. 15, p. 49-56, 2009.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, p.4-29, 2016.

ESTERBAUER, H. **Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 57, n. 5, 1993.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v.43, n. 1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, P. S.; VICTORELLI, F. D.; SANTOS, B. F.; CHORILLI, M. A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p.1-11, 2018.

GINÈS, P. M.D.; CÁRDENA, A. M.D.; ARROYO, V. M.D.; RODÉS, J. M.D. Management of Cirrhosis and Ascites. **New England Journal of Medicine**. v. 350, p 1646-1654, 2004.

GUMUS, T.; ALBAYRAK, S.; SAGDIC, O.; ARIC, M. Effect of gamma irradiation on total phenolic contents and antioxidant activities of *Satureja Hortensis*, *Thymus Vulgaris*, and *Thymbra Spicata* from Turkey. **International Journal Food Properties**, v.14, n.4, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal Natural Product**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HOSSEINI, M.S.; et al. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants in the south of Kerman, Iran. **Journal of Ethnopharmacology**. N.199, p.194-204, 2017.

HUY, L.A.; HE, H.; HUY, C. P. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **Int. J. Biomed Sci.** v. 4, n.2, p. 89–96, 2008.

JESUS, R.S.; PIANA, M.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; ALVES, C.F.S.; BELKE, B.V.; MOSMANN, N.J.; CRUZ, R.C.; SANTOS, R.C.; DALMOLIN, T.V.; BIANCHINI, B.V.;

- CAMPOS, M.M.A.; BAUERMAN, L.F. *In vitro* antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, N.49, p. 296-302.
- KHAN, A.; MOHAMED, A.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. **Medical Sciences**, v.6, n.33, p.1-33, 2018.
- KASOTE, D. M. et al. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. **Int. J. Biol. Sci.** v.11, n.8, p.982-991, 2015.
- KATZUNG, G. FARMACOLOGIA BÁSICA e CLÍNICA. 10a Edição. Porto Alegre (RS). Mc Graw Hill/Artmed. 2010.
- KISMAN, K. G. Plantas Infestantes e Nocivas. **BASF Brasileira**. São Paulo, p. 608, 1991.
- KUMAR, S., PANDEY, A. K. *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. **The Scientific World Journal**, 2013.
- KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v.4, p. 86–93, 2014.
- LAVETI, D.; KUMAR, M.; HEMALATHA, R.; SISTLA, R.; NAIDU, V.G.M.; VERMA, V.; KAUR, N.; NAGPAL, R. Anti-Inflammatory Treatments for Chronic Diseases: A Review. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, n.12, p. 349-361, 2013.
- LEE, J.-H., KIM, J.-H., YOON, Y., JO, C., BYUN, M.-C., 2013. In: Christopher, X.F., Sommers, H. (Eds.), Potential Applications of Ionizing Radiation, in **Food Irradiation Research and Technology**, 2nd ed. Wiley-Blackwell, USA, p. 385.
- LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.
- LIN, L., et al. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: a review. **Journal Ethnopharmacology**. n.159, p.158-183, 2015.
- LOPES, G.; SOUZA, C.; SILVA, L.; PINTO, E.; BERNARDO, J.; MOUGA, T.; VALENTÃO, P. Can Phlorotannins Purified Extracts Constitute a Novel Pharmacological Alternative for Microbial Infections with Associated Inflammatory Conditions?. **Plos one**, v.7, 2012.
- LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil** – nativas e exóticas. Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA. São Paulo, 2002.
- LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, p.1-4, 2008.

MARRONI, N.P.; MARTINS, M.I.M.; PORAWSKI, M. Radicais livres: No processo saúde-doença: da bancada a clínica. Curitiba, 2012.

MASHIMA, R.; OKUYAMA, T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, v. 6, p. 297–310, 2015.

MENDOZA, M. A. M. et al. Toxicología subcrónica de infusión de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) por administración oral en ratones NIH. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 157-170, 2013.

MENSOR, L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, v.140, p. 21-30, 2003.

MILANI, G.B., et al. *Cariniana domestica* fruit peels present topical anti-inflammatory efficacy in a mouse model of skin inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, p. 513-528, 2019.

MIN, H.J., et al. Twelve cases of toxic hepatitis related to the root of *Polygonum multiflorum* Thunb. **Journal of Hepatology**, v. 48. S356, 2008.

MOLDOVAN, M.; LAHMAR, B.; BOGDAN, C.; PARAUAN, S.; TOMUTĂ, I.; CRISAN, M. Formulation and evaluation of a water-in-oil cream containing herbal active ingredients and ferulic acid. **Clujul Medical**, v. 90, n.2, p.212-219, 2017.

MOLINS, R. A. 2 Food irradiation: Principles and applications. **J Wiley & Sons Inc**, p.469, 2001.

OLIVEIRA, L.S.; FERREIRA, S. F.; BARROSO, A. M. Herb Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.): Clinical applications and toxic forms – A review. **JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.7, n. 13, p-464-499, 2014.

World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023, 2014.

PANDEY, A.K.; et al. *In vitro* antibacterial activities of the essential oils of aromatic plants against *Erwinia herbicola* (Lohnis) and *Pseudomonas putida* (Kris Hamilton). **Journal of the serbian chemical society**, v. 77, n.3, p. 313–323, 2012.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal Pharmacol. Pharmacother.** v.2, n. 2, p.74–79, 2011.

PATRÍCIO, F. J.; et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 313-319, 2008.

PENIDO, A.P.; MORAIS, S.M.; RIBEIRO, S.; SILVA, A. Z. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Acta Amaz.** v.46 n.4, 2016.

- PEREIRA, W. S. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 602-605, 2010.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. (4), p. 146-152, 2012.
- PEREIRA, D. M., CORREIA-DA-SILVA, G., VALENTÃO, P., TEIXEIRA, N., ANDRADE, P. B. Anti-Inflammatory Effect of Unsaturated Fatty Acids and Ergosta-7,22-dien-3-ol from *Marthasterias glacialis*: Prevention of CHOP-Mediated ER-Stress and NF-κB Activation. **PLoS ONE**, v.9, 2014.
- PEREIRA, E.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; ANTONIO, A. L.; BUELGA, C.S.; FERREIRA, I.C.F.R. Gamma irradiation improves the extractability of phenolic compounds in *Ginkgo biloba* L. **Industrial Crops and Products**, v.74,144–149, 2015.
- PEREIRA, E.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; VERDE, S. C.; BUELGA, C. S.; FERREIRA, I. C. F. R.; RODRIGUES, P. Is Gamma Radiation Suitable to Preserve Phenolic Compounds and to Decontaminate Mycotoxins in Aromatic Plants? A Case-Study with *Aloysia citrodora* Paláu. **Molecules**, n. 22, p. 347, 2017.
- PEREIRA, E., ANTONIO, A. L., BARREIRA, J. C. M., VERDE, S. C., BARROS, L., OLIVEIRA, M. B. P. P., FERREIRA, I. C. F. R. Evaluation of gamma-irradiated aromatic herbs: Chemometric study of samples submitted to extended storage periods. **Food Research International**, n.111, p. 272–280, 2018.
- PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, p. 1-6, 2012.
- PIO, I. D. S. L. et al. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco river, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, ahead of print, 2018.
- RIBEIRO, R.V. Influência do sumo de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva-de-santa-maria) na contração de feridas cutâneas induzidas em dorso de ratos da linhagem wistar. **Revista Conectionline**, n.3, 2008.
- RIBEIRO, P. V.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, A.; BASTOS, J. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v.56, n.1, p. 253-268, 2018.
- RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 1994.
- RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN:0900767782. Special Edition. Disponível em: <[http:// altweb.jhsph.edu/publications/humane\\_exp/het-toc.htm](http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm)>. Acesso em: 14 maio 2016.

SÁDECKÁ, J. Irradiation of Spices – a Review. **Czech J. Food Sci.** vol. 25, n. 5, p.231–242, 2007.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 7. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, p.403-434, 2017.

SANTOS, G.; AMARAL, A.; SILVA, E.B; Antibacterial activity of irradiated extracts of *Anacardium occidentale* L. on multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Applied Radiation and Isotopes**, p.327-332, 2018.

SELVARAJ, G., KALIAMURTHI, S., THIRUNGNASAMBANDAM, R., VIVEKANANDAN, L., BALASUBRAMANIAN, T. Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. **Biomed. Environ. Sci**, v. 27, n.4, p. 295- 299, 2014.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal.**, v. 43, p. S 85-S 94, 2002.

SILVA, T.C.; ANDRADE, P.B.; MARTINS, F.P.; VALENTAO, P.; PEREIRA, M. *In vitro* anti-Inflammatory and cytotoxic effects of aqueous extracts from the Edible Sea Anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*. *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, p.653, 2017.

SILVEIRA, L.M.S.; et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.2, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 7. ed. Editora da Universidade/UFRGS / UFSC. p. 183, 2017.

SING, A.; DIXIT, G.; KUMAR, A.; MISHRA, S.; SINGH, P.; DWIVEDI, S.; DWIVEDI, S.; TRIVEDI, P.; CHAKRABARTY, D.; MALLICK, S.; PANDEY, V.; DHANKHER, O.; TRIPATHI, R. Nitric Oxide Alleviated Arsenic Toxicity by Modulation of Antioxidants and Thiol Metabolism in Rice (*Oryza sativa* L.). **Front Plant Science**, v.6, 2015.

SOARES, C.; CARVALHO, M.G.; CARVALHO, R.A.; TRINDADE, S.P.; RÊGO, A.C.; FILHO, M.M. *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n.12, p. 813-818, 2015.

SONG, H. Y., KIM, H. M., KIM, W. S., BYUN, E. H., JANG, B. S., CHOI, D. S., & BYUN, E. B. Effect of gamma irradiation on the anti-oxidant and anti-melanogenic activity of black ginseng extract in B16F10 melanoma cells. *Radiation Physics and Chemistry*, 149, p. 33–40, 2018.

STANIMIROVIC, J. et al. A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/ nitrate in rats. **Nitric Oxide**, v. 54, p. 51-59, 2016.

TAHERI, S.; ABDULLAH, T. L.; KARIMI, E.; OSKOUEIAN, E.; EBRAHIMI, M. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents Enhancement with Acute Gamma

Irradiation in *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae) Leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, V.15, p. 13077-13090, 2014.

TOPUZ, A.; OZDEMIR, F. Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sun-dried and dehydrated paprika. **Food Chemistry**, v.4, p. 509-515, 2004.

VARDHAN, P.; SHUKLA, L. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. **International Journal of Radiation Biology**, 2017.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, São Paulo, 2005.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, V. 3, Number. 1, pag. 2 – 20, 2010.

WANG, J.; FANG, X.; GE, L.; CAO, F.; ZHAO, L.; WANG, Z.; XIAO, W. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **Plos one**, v.17, 2018.

WANYO, P., MEESO, N., SIRIAMORNUN, S. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. **Food Chem.** n.157, p.457–463, 2014.

WANNMACHER, L.; BREDEMEIER, M. Uso indiscriminado de Antibióticos e Resistência Microbiana: Uma Guerra Perdida? Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados. Vol. 1 n° 4. Brasília, Março de 2004.

WILNER, I. R.; REUBEN A. Alcohol and the liver. **Current Opinion in Gastroenterology**. v 21, p 323 -330, 2005.

WOJDASIEWCZ, P.; PONIATOWSKI, L. A.; SZUKIEWICZ, D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, v.1, p.19, 2014.

YE, H.; LIU, N.; YU, J.; CHENG, H.; LI, J.; ZHANG, X.Z. Anti-*Helicobacter pylori* activities of *Chenopodium ambrosioides* L. *in vitro* and *in vivo*. **World Journal Gastroenterology**, v.21, n.14, p. 4178–4183, 2015.

ZDUNSKA, K.; DANA, A.; KOLODZIEJCZAK, A.; ROTSZTEJN, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. **Skin Pharmacology Physiology**, v.31, n.6, p.332-336,2018.

ZHU, F., CAI, Y.-Z., BAO, J., CORKE, H. Effect of gamma irradiation on phenolic compounds in rice grain. **Food Chem.** n.120, p.74–77, 2010.