



**TÁSSIA FLÁVIA DIAS CASTRO**

**EMBRIOTOXICIDADE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES  
ANTI-INFLAMATÓRIAS DOS EXTRATOS DE *Eryngium  
foetidum* EM ZEBRAFISH**

**LAVRAS - MG**

**2021**

**TÁSSIA FLÁVIA DIAS CASTRO**

**EMBRIOTOXICIDADE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-  
INFLAMATÓRIAS DOS EXTRATOS DE *Eryngium foetidum* EM ZEBRAFISH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro, Tássia Flávia Dias.

Embriotoxicidade e atividades antioxidantes e anti-inflamatórias dos extratos de *Eryngium foetidum* em zebrafish / Tássia Flávia Dias Castro. – 2021.

122 p. : il.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Apoptose. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Inflamação. I. Murgas, Luis David Solis. II. Título.

**TÁSSIA FLÁVIA DIAS CASTRO**

**EMBRIOTOXICIDADE E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIAS DOS EXTRATOS DE *Eryngium foetidum* EM ZEBRAFISH**

**EMBRYOTOXICITY AND ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *Eryngium foetidum* EXTRACTS IN ZEBRAFISH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 04 de novembro de 2021.

Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dra. Elisangela Elena Nunes Carvalho	UFLA
Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula	UFLA
Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado	UFJ

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2021**

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele eu nada posso fazer e à minha família, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, pela paciência e compreensão com as minhas falhas, pelo acolhimento, ensinamentos e amizade; minha referência de determinação, curiosidade, conhecimento e responsabilidade científica.

Aos meus pais, Joaquim e Carminha, inspiração e razão pela qual este trabalho hoje se concretiza. Por tudo que lutaram e fizeram por mim que eu jamais serei capaz de retribuir. E por me ensinarem os valores fundamentais da vida e de uma família. Em especial, à minha mãe, por ser um verdadeiro modelo de força e vontade de viver.

Ao meu irmão Thiago, por ser uma pessoa tão especial e por sempre me apoiar e incentivar. Meu orgulho é enorme, ao dizer que é o meu irmão e o cara mais incrível que conheço.

Ao Victor Hugo, por estar ao meu lado, em todos os momentos, por me incentivar e motivar neste trabalho, por vibrar comigo nos momentos de conquista e acolher minhas dificuldades, tentando sempre contribuir para a minha superação. Muito obrigada por todo o apoio, incentivo, carinho e compreensão.

A todos os amigos e membros do NEPAD, pelas horas de trabalho e convivência diária, o que contribuiu imensamente para o meu aprimoramento profissional.

Às “meninas” Kiara, Bárbara, Maria de Fátima e Sarah que muito me ajudaram, durante o desenvolvimento do projeto e por boas e divertidas conversas e momentos que tornaram os dias no laboratório mais leves.

Aos “meninos”, Pedro e William e a Tharyn pela amizade, companheirismo, apoio e alguns momentos de descontração. Por terem um coração tão grande, sempre disponíveis a ajudar e por nunca negarem seus “ouvidos” quando precisava desabafar.

À Pâmela e Emanuely, pela amizade e carinho. A interação cotidiana com vocês sempre foi muito importante para mim! Obrigada por fazerem de um simples apartamento “o nosso Lar”.

A todos os professores que fizeram parte de minha formação e contribuíram com minha chegada até aqui.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado e desenvolvimento do projeto de tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Rede Mineira de Bioterismo pelo apoio financeiro na execução dos estudos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**MUITO OBRIGADA!**

“ O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.  
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

Cora Coralina

## RESUMO GERAL

Extratos de plantas são uma mistura de vários compostos bioativos, com propriedades químicas e polaridades variáveis, sendo necessário, portanto a utilização de diferentes testes, para avaliar a atividade antioxidante de um extrato e, principalmente, a seleção do método correto. O primeiro trabalho desta tese consiste de uma revisão sistemática de métodos *in vitro* e *in vivo*, para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, abordando a frequência de uso de diferentes métodos, modelos animais usados e métodos de extração. Scopus e Science Direct foram pesquisados, resultando em 310 artigos, utilizando as palavras-chave (extrato vegetal + antioxidante + *in vitro* + *in vivo*), sendo aceitos para análise dos artigos publicados no período de janeiro a julho de 2020. De acordo com os resultados, existem 17 métodos *in vitro* e 13 *in vivo*, porém os mais utilizados, para as respectivas medidas, DPHH e LPO. Entre os meios de extração, o metanol é o mais utilizado. Além disso, poucos estudos realizaram testes *in vitro* e *in vivo*, simultaneamente (25%) e, quando são utilizados testes *in vivo* (16%), os roedores são os modelos mais empregados. O objetivo do segundo trabalho foi avaliar o efeito e a concentração de diferentes extratos de *E. foetidum* no desenvolvimento de embriões de zebrafish (*Danio rerio*). Para investigar o impacto de extrato aquoso (EA), etanólico (EE) e metanólico (EM), os embriões foram expostos a 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup> até 120 hpf (horas pós-fertilização), para a avaliação da toxicidade no desenvolvimento embrionário e, posteriormente, a 0,039; 0,078; 0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup> a respostas antioxidantes das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e apoptose celular. Os resultados mostraram que, dependendo do solvente de extração, das concentrações utilizadas e tempos de exposição, os extratos de *E. foetidum* ocasionam mortalidade, alteram o tempo de eclosão e promovem diferenças nas atividades enzimáticas. Atrasos no desenvolvimento e aumento da atividade da GST foram encontrados em todos os tratamentos. Não foi observada apoptose em nenhum dos tratamentos. As atividades antioxidantes e anti-inflamatórias dos extratos de *E. foetidum* foram abordadas no terceiro trabalho. Para a determinação da atividade antioxidante, embriões foram expostos ao meio, contendo os extratos (0; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>), acrescidos com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sendo, logo após, medidas as enzimas SOD, CAT e GST e a apoptose celular. A atividade anti-inflamatória foi analisada pelo número de neutrófilos migrados para o local da ferida, na nadadeira caudal nas larvas de zebrafish, após tratamento com os extratos. Larvas expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram atividades elevadas das enzimas SOD e CAT. Entretanto reduções significativas ocorreram na atividade dessas enzimas, quando as larvas foram expostas aos extratos. Para a enzima GST, foi verificado um aumento na atividade para as larvas expostas à EA e EM. A apoptose induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reduzida pelos extratos de maneira dependente da concentração. Em relação à atividade anti-inflamatória, uma redução no número de neutrófilos migrados, para a região lesionada da cauda, foi verificada em larvas tratadas com o extrato etanólico.

**Palavras-chave:** Apoptose. Enzimas antioxidantes. Inflamação. *Danio rerio*.

## GENERAL ABSTRACT

Plant extracts are a mixture of several bioactive compounds, with variable chemical properties and polarities, making it necessary, therefore, to use different tests to assess the antioxidant activity of an extract and especially to select the correct method. The first work of this thesis consists of a systematic review of *in vitro* and *in vivo* methods to evaluate the antioxidant activity of plant extracts, addressing the frequency of use of different methods, animal models used and extraction methods. Scopus and Science Direct were searched, resulting in 310 articles, using keywords (plant extract + antioxidant + *in vitro* + *in vivo*), and articles published from January to July 2020 were accepted for analysis. , there are 17 *in vitro* and 13 *in vivo* methods, with the most used for the respective measurements, DPH and LPO. Among the means of extraction, methanol is the most used. Furthermore, few studies performed *in vitro* and *in vivo* tests simultaneously (25%) and, when *in vivo* tests are used (16%), rodents are the most used models. The objective of the second work was to evaluate the effect and concentration of different extracts of *E. foetidum* on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. To investigate the impact of aqueous extract (EA), ethanolic (EE) and methanolic (EM), embryos were exposed to 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 mg mL<sup>-1</sup> up to 120 hpf (hours after fertilization) for evaluation of toxicity in embryonic development and then to 0.039; 0.078; 0.156; 0.312 and 0.625 mg mL<sup>-1</sup> for antioxidant responses of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and cellular apoptosis. The results showed that, depending on the extraction solvent, concentrations used and exposure times, *E. foetidum* extracts cause mortality, alter the hatching time and promote differences in enzymatic activities. Delays in the development and increased activity of GST were found in all treatments. Apoptosis was not observed in any of the treatments. The antioxidant and anti-inflammatory activities of *E. foetidum* extracts were addressed in the third work. To determine the antioxidant activity, embryos were exposed to the medium containing the extracts (0; 0.039; 0.078; 0.156; 0.312 and 0.625 mg mL<sup>-1</sup>) added with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and subsequently measured by the enzymes SOD, CAT and GST and cell apoptosis. The anti-inflammatory activity was analyzed through the number of neutrophils migrated to the wound site in the caudal fin in zebrafish larvae after treatment with the extracts. Larvae exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed high activities of SOD and CAT enzymes. However, significant reductions occurred in the activity of these enzymes when the larvae were exposed to the extracts. For the GST enzyme, an increase in activity was verified for larvae exposed to EA and EM. Apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was reduced by the extracts in a concentration-dependent manner. Regarding the anti-inflammatory activity, a reduction in the number of neutrophils migrating to the injured region of the tail was verified in larvae treated with the ethanol extract.

**Keywords:** Apoptosis. Antioxidant enzymes. Inflammation. *Danio rerio*.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEORICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Hortaliças não convencionais</b> .....	13
<b>2.1.1</b>	<b>Família apiaceae - gênero <i>Eryngium</i></b> .....	14
<b>2.1.1.1</b>	<b><i>Eryngium foetidum</i></b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Radicais livres e antioxidantes</b> .....	17
<b>2.2.1</b>	<b>Sistema de defesa antioxidante</b> .....	17
<b>2.2.1.1</b>	<b>Enzimas antioxidantes</b> .....	18
<b>2.3</b>	<b>Inflamação</b> .....	19
<b>2.3.1</b>	<b>Papel dos neutrofilos na inflamação</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Zebrafish como modelo animal de pesquisa</b> .....	21
<b>2.4.1</b>	<b>Zebrafish como modelo animal para estudos de extratos vegetais</b> .....	23
<b>2.4.1.1</b>	<b>Avaliação da toxicidade e atividade antioxidante</b> .....	24
<b>2.4.1.2</b>	<b>Avaliação da atividade anti-inflamatória</b> .....	29
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
	<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS</b> .....	44
	<b>ARTIGO 1 - METHODOLOGIES FOR DETERMINING THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS: SYSTEMATIC REVIEW</b> .....	44
	<b>ARTIGO 2 - OS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE EXTRATOS DE <i>Eryngium foetidum</i> EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH SÃO DEPENDENTES DO TIPO DE EXTRAÇÃO, DA DOSE E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO</b> .....	74
	<b>ARTIGO 3 - EFEITO PROTETOR CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE <i>Eryngium foetidum</i> EM EMBRIÕES E LARVAS ZEBRAFISH</b> .....	98

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

As hortaliças não convencionais são as hortaliças que estiveram presentes nas refeições familiares, mas, com o passar dos anos, foram caindo em desuso pela população, em razão do consumo rotineiro das hortaliças convencionais mais conhecidas, pelas poucas informações sobre as suas potencialidades nutricionais e pelo crescente uso de alimentos industrializados. São plantas ricas em uma série de compostos bioativos e, por essa razão, a ciência acredita que as plantas sejam uma importante fonte de novas substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos, atuando na prevenção ou tratamento de doenças em humanos e animais e /ou proporcionando benefícios à saúde (RANGANATHAN et al., 2020).

Entre essas hortaliças, *Eryngium foetidum*, uma espécie da família Apiaceae, é popularmente conhecida como chicória. Seu uso principal é como condimento, mas, como planta medicinal, é utilizada para o tratamento de diversas doenças, como dores de cabeça e estômago, hepatite, infecções, inflamações, bronquite, entre outras. Triagens fitoquímicas indicaram presença de compostos funcionais como terpenoides, glicosídeos, flavonoides, polifenóis, esteroides e tanino.

Estudos avaliando a eficiência e as limitações desses compostos, que aumentariam a abrangência da *E. foetidum* no campo terapêutico, parâmetros farmacológicos *in vivo*, comprovaram que os extratos foliares dessa planta apresentam atividades antimicrobiana, anticlastogênica, antidiabética, antioxidante e anti-inflamatória. Embora esses relatórios sobre aplicações de *E. foetidum* estejam disponíveis, investigações *in vivo* sobre seus princípios ativos, suas atividades farmacológicas e dados toxicológicos ainda são escassos. Em virtude de sua grande utilização popular, é de suma importância a realização de estudos que possam fornecer informações necessárias para a comprovação de sua eficácia e segurança.

O zebrafish (*Danio rerio*) tornou-se um modelo promissor para triagem da toxicidade e as atividades antioxidante e anti-inflamatória de extratos vegetais. Os testes com embriões/larvas de zebrafish requerem poucas amostras, facilitando, quando dispomos de pouco material, o processo de desenvolvimento pode ser observado de maneira fácil, direta, não invasiva, facilitando a análise da toxicidade do desenvolvimento. As respostas oxidativas e inflamatórias podem ser facilmente induzidas e visualizadas no zebrafish, particularmente nos

estágios iniciais, sendo utilizados na análise *in vivo* de moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias (ZAMPIERI et al., 2020).

Baseado nos argumentos apresentados e diante da importância nutricional e carência da população por alimentos saudáveis e fontes naturais de substâncias protetoras à saúde, objetiva-se, com este estudo, avaliar a toxicidade e as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Eryngium foetidum* utilizando embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal.

## 2 REFERENCIAL TEORICO

### 2.1 Hortaliças não convencionais

São denominadas hortaliças não convencionais espécies hortícolas presentes em determinadas localidades ou regiões, mas que tiveram seu uso esquecido ou desvalorizado, ao longo dos anos (VIANA et al., 2015).

As hortaliças não convencionais deixaram de ser utilizadas, especialmente, em razão do consumo rotineiro das hortaliças convencionais mais conhecidas, como, por exemplo, a alface ou repolho, pelas poucas informações sobre as suas potencialidades nutricionais e pelo crescente uso de alimentos industrializados (BRASIL, 2010; SFOGLIA et al., 2019). São também espécies que não estão organizadas, enquanto cadeia produtiva, levando a pouco ou nenhum interesse econômico por parte dos produtores com relação a elas. Em razão disso, quando comercializadas, possuem disponibilidade restrita no mercado e são encontradas especialmente em feiras e em propriedades da agricultura familiar (BRASIL, 2010).

Um aspecto importante das hortaliças não convencionais é que elas apresentam quantidades significativamente maiores de teores nutricionais que as hortaliças comumente utilizadas na alimentação (VIANA et al., 2015; SILVA et al., 2018). Um exemplo é o caso das folhas do dente-de-leão, que possui de duas a três vezes mais cálcio, ferro, fósforo e vitaminas C, A e as do complexo B que as folhas de uma alface convencional (KELEN et al., 2015). Outra vantagem sobre as hortaliças convencionais é que enquanto estas necessitam de aplicação de agrotóxicos à sua produção, as não convencionais, por serem espécies bem adaptadas, crescem espontaneamente, em diferentes condições climáticas e regiões, dispensando o uso de fertilizantes e agrotóxicos (PASCHOAL et al., 2016). Portanto podem ser boas opções de cultivo para agricultores familiares, apresentando um grande potencial do ponto de vista agrônomo e da saúde.

O resgate e valorização do consumo dessa classe de hortícolas significa ganhos não só econômicos, mas sociais e culturais, pois visa, além de outros fatores, à preservação da biodiversidade, novas fontes de antioxidantes naturais para a indústria alimentícia, além dos seus benefícios nutricionais (KINUPP & BARROS, 2008; VIANA et al., 2015; DA SILVA et al., 2018).

Hortaliças não convencionais, como todos os vegetais, são fonte de uma série de compostos bioativos que são importantes como mecanismos de defesa contra os mais variados agentes causadores de doenças nas plantas e, por consequência, favorecem o seu sucesso

adaptativo. Muitos desses compostos bioativos têm valor agregado e podem ser utilizados como medicamentos, cosméticos, defensivos agrícolas e alimentos (SFOGLIA et al., 2019). Em alimentos, tais compostos podem ser utilizados como flavorizantes, aromatizantes, pigmentos e, também, como fontes nutricionais complementares. Como fontes nutricionais, se consumidos diariamente, podem contribuir diretamente para a redução do risco de ocorrência de diversas doenças, pois inibem processos oxidativos, reduzindo a concentração de radicais livres que estão associados ao envelhecimento celular e a doenças (KINUPP & LORENZI, 2014; VIANA et al., 2015; DA SILVA et al., 2018).

São exemplos de algumas hortaliças não convencionais, representantes da cultura brasileira: almeirão-de-árvore (*Lactuca cf. canadensis* – Asteraceae), araruta (*Maranta arundinacea* L. – Amarantaceae), azedinha (*Rumex acetosa* L. – Polygonaceae), beldroega (*Portulaca oleracea* L. – Portulacaceae), bertalha (*Basella alba* - Basellaceae), capuchinha (*Tropaeolum majus* L. – Tropaeoleceae), ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill. – Cactaceae), peixinho (*Stachis byzantina* – Lamiaceae), taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott – Araceae), serralha (*Sonchus oleraceus* L. – Asteraceae), entre outras (BRASIL, 2010). Além dessas, também é considerada hortaliça não convencional a espécie de chicória, *Eryngium foetidum* e, por ser foco das nossas pesquisas, teve suas características, informações etnobotânicas, composição fitoquímica e outros aspectos abordados, conforme a seguir.

### 2.1.1 Família apiaceae - gênero *Eryngium*

A família Apiaceae representa uma das maiores famílias de angiospermas, distribuídos mundialmente, com 454 gêneros e aproximadamente 3780 espécies (SAYED-AHMAD et al., 2017). No Brasil, ocorrem oito gêneros e 100 espécies (SOUZA, 2005).

Essa família possui um elevado valor econômico, visto que fornece um grande número de plantas usadas, para diversos fins, incluindo nutrição, medicamentos, bebidas, especiarias, repelentes tingimentos, cosméticos, fragrâncias e usos industriais (SAYED-AHMAD et al., 2017). Além desses fatores, é uma família que contém espécies comumente utilizadas na alimentação, como a cenoura (*Daucus carota*), mandioquinha ou batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza*), batata-baroa (*Chaerophyllum bulbosum*); salsa (*Petroselinum crispum*), aipo ou salsão (*Apium graveolens*), coentros (*Coriandrum sativum*), cominho (*Cuminum cyminum*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), entre outros (FLORA DO BRASIL, 2020). Sua utilização, como alimentos e especiarias, deve-se à natureza aromática da folhagem e dos frutos,

enquanto sua variedade distinta de compostos químicos lhes confere finalidade medicinal (PARVEN et al., 2019).

O gênero *Eryngium* é o maior e, provavelmente, o gênero mais taxonomicamente complexo e rico da família Apiaceae, possuindo 274 espécies em todo o mundo (CELIK et al., 2019; SEPANLOU et al., 2019). No Brasil, ocorrem 56 espécies amplamente distribuídas em todo o território (FLORA DO BRASIL, 2020). A grande maioria das espécies desse gênero tem por finalidade o uso como especiarias, enquanto outras são utilizadas como remédios fitoterápicos (PAUL et al., 2011; ERDEM et al., 2015). São espécies que, de acordo com análises fitoquímicas, constituem rica fonte de flavonoides, taninos, saponinas e triterpenoides (SOUZA, 2016).

#### 2.1.1.1 *Eryngium foetidum*

*Eryngium foetidum* é uma planta herbácea, de 8-40 cm de altura (FIGURA 1). Possui fácil crescimento, produz sementes, ao longo do ano e sua germinação pode ocorrer de sete a 90 dias (DA SILVA et al., 2016). Nativa da América Central e atualmente cosmopolita, a espécie é encontrada em regiões tropicais e subtropicais (CARDOZO et al., 2004). É popularmente conhecida como Chicória-do-Pará, coentro-da-índia, coentro-castelo, coentro-bravo, coentro-da-folha-larga, coentro-japonês, chicória, chicória-de-caboclo, chicória-do-amazonas (GOMES et al., 2013).

Figura 1 - *Eryngium foetidum*.



Fonte: Do autor.

A planta inteira ou suas partes são comumente usadas na medicina tradicional, como remédios caseiros, para tratar queimaduras, dores de ouvido, febres, hipertensão, prisão de ventre, convulsões, asma, dor de estômago, complicações de infertilidade, picadas de cobra,

diarreia e malária. Os extratos das folhas são usados para tratamento de problemas hepáticos e artrite (SHAVANDI et al., 2012; LEISHANGTHEM & SHARMA, 2014; YUHLUNG & BHATTACHARYYA, 2014; MALIK et al., 2016). Também documenta-se sua utilização para epilepsia, vômitos, tosses, paralisia, pneumonia e alívio de dores menstruais (LANS, 2007; PAUL et al., 2011). Na Colômbia, a planta inteira é usada para tratar flatulência, gripe, indigestão, varíola, problemas estomacais e como vermífugo (BUSSMANN et al., 2018). No Brasil, uma decocção de toda a planta é usada, para facilitar o parto, por provocar contrações uterinas, sendo contraindicada durante a gravidez (RODRIGUES, 2007; COELHO-FERREIRA, 2009; YAZBEK et al., 2016). Um chá feito com a raiz é útil em caso de infecção urinária (COELHO-FERREIRA, 2009).

As partes aéreas de *E. foetidum* são ricas em vários nutrientes, incluindo vitaminas (C e E) e caroteno. A triagem fitoquímica preliminar de extrato aquoso de folhas indicaram a presença de glicosídeos, flavonoides, terpenoides, esteroides e taninos (LINGARAJU et al., 2016). Também podem ser encontrados polifenóis, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico, uma saponina e vários triterpenoides (SINGH et al., 2013). Aldeídos e sesquiterpenos foram as classes predominantes encontrados nas avaliações químicas do óleo de *Eryngium foetidum*, sendo o composto *E*-2-dodecenal o de maior concentração e importância nos óleos dessa planta (THOMAS et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020). O estigmasterol, um esterol predominante do extrato orgânico da folha, possui atividade anti-inflamatória tópica contra inflamação aguda e crônica em modelo animal (GARCIA et al., 1999).

Parâmetros farmacológicos avaliados *in vivo* comprovaram que os extratos foliares dessa planta apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas e antimicrobianas, sendo responsáveis por elas os compostos flavonoides e fenólicos (PRABHA et al., 2019). A atividade antimicrobiana, conferida por terpenoides, glicosídeos, flavonoides, esteroides e tanino, possibilita a sua utilização como agente antimicrobiano em drogas para a terapia de doenças infecciosas, causadas por patógenos (LINGARAJU et al., 2016). *E. foetidum* também apresenta atividades anticlastogênicas e efeito citoprotetor, pela presença dos compostos ativos terpenoides, fitosteróis e polifenóis, flavonoides, sugerindo que o seu consumo diário possa gerar benefícios à saúde em termos de proteção a células e seu material genético (PROMKUM et al., 2012; RAUNELLI et al., 2019).

## 2.2 Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres compreendem um grupo de átomos e moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, em sua última camada eletrônica e, por isso, são instáveis, altamente reativos e capazes de se ligar, de forma inespecífica, com qualquer composto situado próximo à sua camada eletrônica livre (PANDEY & TYAGI, 2020). São formados por reações de óxido, redução ou por reações enzimáticas catalíticas, sendo essas reações ocorridas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular (MANACH et al., 2004; CAROCHO & FERREIRA, 2013) De acordo com seu átomo central, tais radicais podem ser divididos em quatro categorias: oxigênio, nitrogênio, cloro e enxofre. Os radicais que contêm oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e referem-se a uma gama de produtos derivados do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), sejam eles espécies radicais livres, quanto espécies não radicalares (como o peróxido de hidrogênio) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

Em condições fisiológicas normais, as moléculas de EROs, como peróxido de hidrogênio, radicais como ânion superóxido, hidroxila e peroxila, são produzidos naturalmente pelo corpo, como resultado do metabolismo do oxigênio. Entretanto exposição a xenobiótico ou compostos químicos tóxicos conduzem a uma elevada formação endógena e exógena de EROs, sendo, posteriormente, eliminadas do organismo pela ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BARAN et al., 2018). Sua eliminação é necessária, em razão das suas naturezas altamente reativas, as EROs podem causar lesão em constituintes importantes das células, ocasionando danos às proteínas, aos lipídios das membranas celulares e até mesmo ao DNA (LACKMANN et al., 2018).

Apesar do organismo trabalhar para eliminar a EROs, pode haver um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação pela atividade dos antioxidantes. Isso pode ocorrer pela falha no sistema de defesa antioxidante ou danos nos sistemas biológicos, levando as células a desenvolverem um estresse oxidativo. Sendo assim, o estresse oxidativo é o resultado do excesso de radicais livres nas células e é um importante fator que pode induzir apoptose e necrose das células (KÖKTÜRK et al., 2020).

### 2.2.1 Sistema de defesa antioxidante

Em indivíduos saudáveis, os níveis das EROs são controlados pela ação dos sistemas antioxidantes. As condições antioxidantes correspondem a sistemas de proteção dos

organismos contra o processo de estresse oxidativo, visando manter o estado redox celular, seja atrasando, removendo ou prevenindo o dano (COTINGUIBA et al., 2013). Nas células, os antioxidantes podem atuar, por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático, que podem ou não atuarem em conjunto.

O sistema antioxidante não enzimático é constituído por micromoléculas que podem ter origem endógena, como pigmentos biliares, urato, proteínas de transporte de metais (como a metalotioneína) ou dietética como vitaminas C, E e A (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018; JAKUBCZYK et al., 2020; SEYIDOGLU et al., 2020).

Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas, também conhecidos como antioxidantes naturais e é o primeiro sistema a agir contra os radicais livres. Esse sistema é composto principalmente pelas enzimas, superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione-S-transferase (GST) (COTINGUIBA et al., 2013; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018; SEYIDOGLU et al., 2020).

### 2.2.1.1 Enzimas antioxidantes

#### Superóxido desmutase

As enzimas superóxido desmutase (SOD) são metaloenzimas que fazem parte da primeira linha de defesa contra quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio. Elas convertem ânions de superóxido de radical livre ( $O_2^{\cdot -}$ ) em moléculas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), conforme a reação abaixo (EQUAÇÃO 1). Este  $H_2O_2$  posteriormente será degradado em água e oxigênio, livrando, assim, as células do risco de oxidação por esses radicais (JI et al., 2020).



#### Catalase

A catalase é umas das enzimas antioxidantes endógenas, localizada principalmente nos peroxissomos, mas também na mitocôndria e no núcleo (RIGHI et al., 2020). Como o peróxido de hidrogênio é tóxico para as células, essa enzima é responsável por catalisar o

peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, conforme reação abaixo (EQUAÇÃO 2) (JI et al., 2020).



### **Glutathione-S-Transferase (GST)**

A glutathione-S-transferase (GST) é uma enzima desintoxicante, envolvida na correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos, atuando por meio da catalisação da conjugação de glutathione reduzida (GSH) a uma ampla variedade de substratos, neutralizando seus locais eletrofílicos, tornando-os menos tóxicos, mais solúveis em água, logo mais facilmente excretados (CHATTERJEE & ANUPAM, 2018). Xenobiótico é o termo utilizado para designar qualquer substância química estranha presente num sistema biológico (MÍDIO, 1992).

### **2.3 Inflamação**

A resposta inflamatória, ou inflamação é a resposta protetora do sistema imune inato a agressões, sejam tecidos lesados ou agentes infecciosos, com o objetivo de restaurar a homeostase tecidual. O processo envolve células residentes em tecidos, vasos sanguíneos, proteínas, entre outros mediadores e células imunológicas, como neutrófilos e macrófagos. Todos esses fatores trabalham juntos, para eliminar a causa do dano, limpar quaisquer células e tecidos mortos resultantes desse dano e iniciar a reparação do tecido (FREIRE & VAN DYKE et al., 2013; YANG et al., 2018).

O processo inflamatório pode ser separado em três etapas: recrutamento, pico da inflamação e resolução. Quando um tecido é lesado, ocorre a liberação de sinais químicos, os quais proporcionam a vasodilatação local e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, ocorrendo assim o processo denominado de diapedese, em que os eletrólitos, pequenas e grandes moléculas, juntamente com água e células imunológicas, migram do espaço extracelular em direção ao tecido lesionado, acarretando em uma inflamação aguda (CRUVINEL et al., 2010).

No processo de recrutamento, os macrófagos e neutrófilos são superativados e induzem à produção de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6) e mediadores inflamatórios (MURALIDHARAN & MANDREKAR, 2013). Os neutrófilos, na área inflamada, fagocitam

os patógenos invasores, liberam armadilhas extracelulares e geram ROS (espécies reativas de oxigênio) (FOX et al., 2010). Portanto o recrutamento de macrófagos e neutrófilos ao tecido inflamado é considerado o pico da inflamação aguda. A migração de neutrófilos é de suma importância, para respostas fisiológicas a lesões e infecções ao tecido, no entanto a sua atividade descontrolada e excessiva conduz para inflamações persistentes, dano tecidual ou surgimento de doenças (YANG et al., 2018).

A última etapa é resolução da inflamação que precisa ser eficiente e controlada, sendo necessária a eliminação dos neutrófilos, por meio de apoptose, seguida pelo englobamento de macrófagos e/ou migração reversa, em que os neutrófilos voltam para o vaso sanguíneo ou tecido distante (FARRERA & FADEEL, 2013; HENRY et al., 2013). Havendo erros nessa etapa tal como neutrófilos persistirem no local e ocorrer liberação de compostos nocivos, falha na remoção dos patógenos e no engolfamento das células inflamatórias apoptóticas e um retardo da apoptose resulta na inflamação crônica (HENRY et al., 2013). Essa é de longa duração (dias a anos) e é caracterizada pelo influxo de macrófagos e linfócitos, ocasionando os seus componentes, danos e lesões nos tecidos envolvidos, levando ao desenvolvimento de doenças, como doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, Alzheimer e câncer (FREIRE & VAN DYKE, 2013; YANG et al., 2018; PAHWA & JIALAL, 2019).

### **2.3.1 Papel dos neutrófilos na inflamação**

Os neutrófilos possuem tempo médio de vida, varia de 6 a 8 horas (SADIK, et al., 2011; ROSALES, 2018). Entretanto, quando migram para o tecido inflamado, o seu tempo de vida é prolongado para dois a seis dias, por uma retardação da sua apoptose, sendo sua sobrevivência controlada pela liberação de citocinas, quimiocinas e produtos microbianos (BORREGAARD, 2010). O seu tempo de vida curto, juntamente com a questão de serem células extremamente móveis, explica o porquê dessas células predominarem, nas fases iniciais do processo inflamatório, em relação aos outros tipos celulares (BECHARA & SZABÓ, 2006).

Em um organismo saudável, os neutrófilos circulantes encontram-se em estado de repouso, sendo ativados por produtos bacterianos, citocinas ou quimiocinas ou outras substâncias produzidas pelas próprias células do tecido lesado (OKIN & MEDZHITOV, 2012). Uma vez ativados, os neutrófilos migram em número elevado, para as áreas de inflamação, realizando diversas funções, como a liberação de enzimas líticas presentes em

seus grânulos (os quais possuem um grande potencial microbiano) e atuando como fagócitos, tanto de patógenos quanto de restos celulares (GEERING et al., 2013; MAYADAS et al., 2014, ROSALES, 2018).

Apesar da sua migração, para locais de inflamação serem essenciais às respostas fisiológicas a lesões e infecções de tecidos, a atividade descontrolada ou recrutamento excessivo dos neutrófilos podem levar a inflamações persistentes, dano tecidual e ocasionar doenças (GERNEZ et al., 2010). Isso porque, quando ativados, os neutrófilos induzem à produção, além das citocinas pró-inflamatórias, mediadores inflamatórios, como prostaglandina E2 e o óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteases (elastase neutrofílica, metaloproteinases e catepsina G), os quais promovem lesão tecidual (TRIPATHI et al., 2007; MILLS & O'NEILL, 2016). Dessa forma, para resolver a inflamação, os neutrófilos devem ser eliminados de maneira eficiente e controlada, seja por apoptose e envolvimento de macrófagos, seja pela saída do local da inflamação por meio da migração reversa (HENRY et al., 2013; FARRERA et al., 2013).

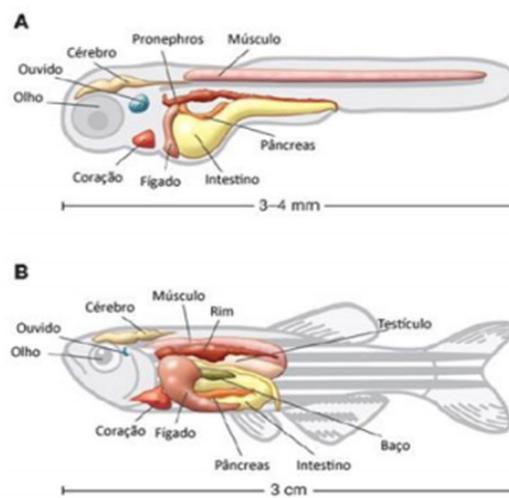
Portanto estratégias de descobertas de drogas, para o tratamento da inflamação devem ser desenvolvidas, buscando prevenir ou tratar doenças associadas a condições inflamatórias crônicas, promovendo a eliminação de neutrófilos e macrófagos e/ou prevenindo o seu recrutamento (YANG et al., 2018).

## **2.4 Zebrafish como modelo animal de pesquisa**

O zebrafish (*Danio rerio*; família Cyprinidae) é um pequeno teleosteo de água doce, é um modelo animal bem estabelecido para uma ampla gama de áreas de pesquisa da biomedicina à toxicologia (BERGERON et al., 2008). Entre inúmeras vantagens em sua utilização, pode-se destacar: baixo custo de manutenção, facilidade na reprodução, fecundação externa, rápido desenvolvimento embrionário, curto intervalo de geração (três a quatro meses para a maturidade sexual), fácil manipulação, tanto das matrizes quanto dos embriões e transparência dos ovos fecundados. Os zebrafish juvenis e adultos, por não serem transparentes, a geração da linhagem mutante “Casper” não pigmentada pode ser cruzada com linhagens transgênicas fluorescentes para auxiliar na observação e imagem de sistemas de órgãos em animais adultos (WHITE et al., 2008). É também uma matriz de pequeno tamanho, com produção constante de ovos, alta taxa de sobrevivência larval e baixo custo de manutenção (MEYER, 2018; PADILLA & GLABERMAN, 2020).

O ponto determinante, para o sucesso do zebrafish, como modelo experimental na pesquisa científica, reside nas suas características e semelhança com seres humanos. Possui uma similaridade genética em torno de 73% com os humanos e 84% dos potenciais genes relacionados com doenças (HOWE et al., 2013). Além disso, muitas das características anatômicas e fisiológicas desses animais são altamente homólogas aos seres humanos, como ilustrado na Figura 2 (SCHMIDT et al., 2013; NISHIMURA et al. 2015).

Figura 2 - O zebrafish contém basicamente a mesma estrutura que os animais superiores. Desenho que descreve os órgãos internos do zebrafish (A) no estágio larval (3-5hpf) e (B) no adulto.

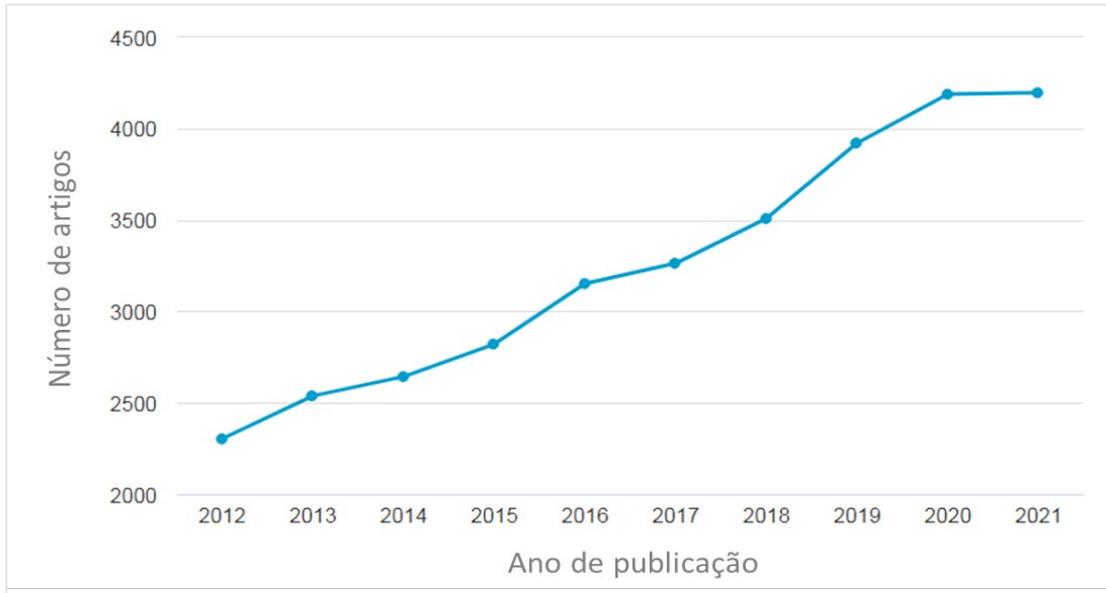


Fonte: FÉNERO, 2015.

Os estudos, utilizando o modelo zebrafish, contribuíram para o avanço, em muitos campos da ciência, desempenhando papéis significativos em pesquisas fundamentais, como ciência evolutiva, genética, neurobiologia e biologia do desenvolvimento (HOO et al., 2016). Nos últimos 10 anos, seu uso, como modelo animal, apresentou um crescimento exponencial na pesquisa científica (FIGURA 3), em razão não apenas de todas as suas características citadas anteriormente, mas também pelo fato da sua utilização seguir os princípios da substituição, redução e refinamento (3Rs), algo bastante debatido, atualmente, na área da experimentação animal. Substituição, pelo fato de que as larvas de zebrafish podem ser usadas, substituindo alguns estudos em outros animais. A redução pode ser observada, principalmente, em estudos de toxicidade, em que o zebrafish é utilizado para identificar candidatos a drogas tóxicas, permitindo que moléculas mais seguras sejam testadas, em modelos de mamíferos, reduzindo, dessa forma, o número de animais usados nos testes. O refinamento é obtido, em estudos com embriões e larvas, pois, por serem fertilizados

externamente e transparentes, permitem sua observação de uma forma não invasiva (CASSAR et al., 2019).

Figura 3 - Levantamento do número de artigos utilizando o zebrafish (*Danio rerio*), como modelo animal em pesquisa, nos últimos 10 anos.



Fonte: Scopus (Editora Elsevier) <acesso em 16/11/2021>.

#### 2.4.1 Zebrafish como modelo animal para estudos de extratos vegetais

Os modelos animais mais utilizados em estudos *in vivo* com extratos de plantas são os roedores (HUANG et al., 2020; LIU et al., 2020; SHABBIR et al., 2020; SOUID et al., 2020). Entretanto, pelo alto custo de sua utilização, o baixo rendimento e a necessidade da utilização de grande quantidade de extratos, tem havido uma busca por novos métodos que possam contribuir e /ou substituir os existentes com roedores.

Neste cenário, o zebrafish tornou-se um modelo alternativo promissor para rastrear a toxicidade e as atividades antioxidante e anti-inflamatória de extratos de plantas. Para os ensaios, embriões e larvas de zebrafish são os mais utilizados, pois, por serem de pequeno tamanho, possibilitam os testes em placas de poços, requerem poucas amostras, facilitando, sobretudo, quando dispomos de pouco material, como no caso de extratos vegetais e possibilita a dissolução dos compostos diretamente no meio de desenvolvimento desses animais (NAJJAR et al., 2017; XIA et al., 2017a). Além disso, pela transparência dos embriões e larvas, o processo de desenvolvimento pode ser observado de maneira fácil, direta, não invasiva, facilitando a análise da toxicidade do desenvolvimento (XIA et al., 2017a).

É importante destacar que, mesmo que o zebrafish seja um modelo benéfico à avaliação da segurança dos extratos de plantas ou medicamentos, apresenta algumas limitações, incluindo a dissimilaridade de alguns órgãos, como pulmões, tecido mamário e próstata (TSHERING et al., 2021). Ainda, os extratos que não são solúveis em água podem ser problemáticos para administrar imersão em água.

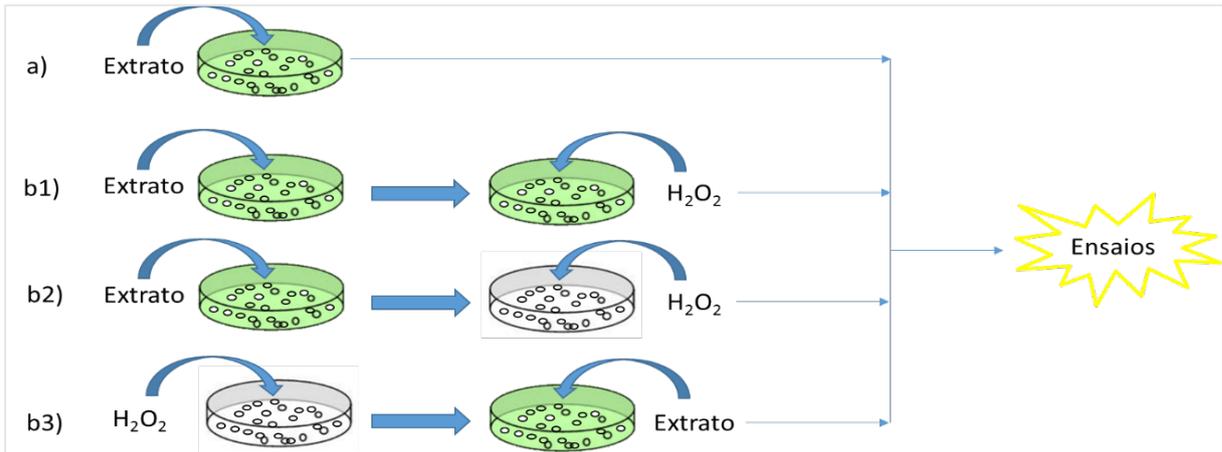
#### **2.4.1.1 Avaliação da toxicidade e atividade antioxidante**

Para a avaliação da toxicidade e atividade antioxidante de extratos vegetais, utilizando o zebrafish, algumas metodologias permitem, por meio do mesmo método, avaliar esses dois parâmetros e, por isso, esses tópicos são abordados aqui de forma conjunta. A descrição dos métodos de avaliação está presente na Tabela 1.

Para a avaliação da toxicidade, os embriões/larvas de zebrafish são expostos aos extratos vegetais, sendo, posteriormente, realizados os protocolos (ensaios) para determinação dos efeitos tóxicos desses extratos (FIGURA 4a). Vários estudos relatam esses efeitos, como um aumento da mortalidade, malformações embrionárias, morte celular e estresse oxidativo (TABELA 2).

Para a determinação das propriedades antioxidantes dos extratos, geralmente, são realizados testes que avaliam a redução de um estresse oxidativo induzido, diante de um pré ou pós-tratamento dos embriões/ larvas com os extratos (FIGURA 4b1-3). Os agentes indutores desse estresse podem ser peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), arsênio, lipopolissacarídeo (LPS), entre outros (UDAYA et al., 2020; WANG et al., 2019). Segundo Udaya et al. (2020), a redução do estresse oxidativo, da mortalidade /alterações morfológicas, diminuição da morte celular e das atividades dos antioxidantes enzimáticos, em embriões submetidos ao agente indutor do estresse tratados com extratos, em comparação com apenas embriões tratados com o agente indutor, sugere uma propriedade antioxidante potencial dos extratos, como nos exemplos na Tabela 2.

Figura 4 - Metodologia de toxicidade e atividade antioxidante de extratos vegetais, em embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*). (a) no teste de toxicidade, os embriões/larvas são expostos aos extratos e permanecendo nele até os ensaios. (b 1-3) no teste de atividade antioxidante, os embriões/larvas são submetidos ao estresse oxidativo, podendo o agente indutor (EX:  $H_2O_2$ ): (b1e2) ser colocado, após o tratamento dos embriões/larvas com extrato, (b3) antes do tratamento com os extratos. Além disso, nos tratamentos em que o extrato é testado como pré-tratamento, os extratos (b1) podem ou (b2) não permanecer no meio durante a indução do estresse oxidativo.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 1 - Descrição dos métodos para a avaliação da toxicidade e atividade antioxidante de extratos vegetais utilizando embriões/larvas de zebrafish como modelo animal.

(Continua)

Avaliação	Método	Descrição	Referências
<b>Mortalidade e alterações morfológicas</b>	Fet Test.	Realizado baseado na diretriz 236 (FET TEST) da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), em que embriões, logo após a eclosão, são expostos a diferentes concentrações da substância teste; em geral são testadas cinco concentrações e avaliadas mortalidades e alterações morfológicas de embriões/larvas a cada 24 h, durante um período de 96-120hpf.	OECD, Test. No. 236 (2013)

Tabela 1 - Descrição dos métodos para a avaliação da toxicidade e atividade antioxidante de extratos vegetais utilizando embriões/ larvas de zebrafish como modelo animal.

(Conclusão)

Avaliação	Método	Descrição	Referências
<b>Antioxidantes enzimáticos</b>	Nível de atividade das enzimas (CAT, SOD e GST)	A atividade da CAT é medida pelo decaimento da absorvância, ao longo do tempo, ocasionado pela redução/ decomposição do peróxido de hidrogênio, em gás oxigênio e água pela CAT, presente na amostra. Para a medição da SOD, o método é baseado na capacidade dessa enzima de inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pelos radicais superóxidos produzidos pela decomposição da hidroxilamina em meio alcalino. Os radicais superóxidos, quando reagem com NBT, produzem um corante de cor púrpura/ rósea (formazan). Dessa forma, quanto menor a atividade da SOD, maior a quantidade formada de cromóforo róseo e vice-versa. A técnica, para a avaliação da atividade da GST, tem como princípio o uso do CDNB como substrato, para que a enzima (GST), presente na amostra, conjugue a GSH ao CDNB, formando o conjugado glutathiona-2,4-dinitrobenzeno, um cromóforo detectável em 340 nm. Sendo assim, quanto maior a quantidade de conjugado formado, maior a atividade da GST. A atividade dessas enzimas é realizada a partir do homogenato das larvas de zebrafish de 96hpf.	SONG et al. (2009); GU et al. (2019) e VELKI et al. (2019)
<b>Apoptose</b>	Laranja de acridina - AO	O AO consiste de um corante fluorescente que possui alta afinidade pelo DNA e RNA, ligando-se a essas moléculas nas células necróticas ou apoptóticas. Em células vivas, AO, que é fracamente básico, é sequestrado em compartimentos ácidos, como lisossomos e é impedido de entrar no núcleo. Quando uma célula recebe um sinal de morte, as mitocôndrias param de funcionar, causando a perda do gradiente de pH nos lisossomos. Então, o AO é liberado no citoplasma, em que é capaz de entrar no núcleo, ligar-se ao DNA, parcialmente desenrolado e tornar-se altamente fluorescente. A utilização desse corante e a medição de sua fluorescência no zebrafish ocorre da mesma forma que para o estresse oxidativo, apresentando também a vantagem de poder ser realizada em um modelo animal vivo.	MERGLIANO & MINDEN (2003); XIA et al. (2017b) e ZHAO et al. (2019)

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: HPF- horas pós-fertilização, CAT- catalase, SOD- superóxido desmutase, GST- glutathiona-s- transferase, CDNB-1-cloro-2,4- dinitrobenzeno.

Tabela 2 - Toxicidade e atividade antioxidantes de extratos vegetais em embriões/ larvas de zebrafish.

(Continua)

TESTES	PLANTAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
		Embriões e larvas de zebrafish, após exposição aos extratos apresentaram:	
Toxicidade Fet Test. / AO	<i>Milletia pachycarpa</i> e <i>Croton tiglium</i>	Edema de pericárdio e de saco vitelínico, curvatura da coluna e inibição da eclosão. Células apoptóticas foram observadas, ao longo do corpo das larvas expostas ao extrato, com fluorescência aumentada nas regiões do coração, cérebro, olhos e tronco.	Yumnamcha et al. (2015) e Yumnamcha et al. (2020)
	<i>Piper nigrum</i>	Edema de pericárdio e de saco vitelínico, inibição da eclosão. Células apoptóticas foram encontradas na região da cabeça e coluna e, na maior concentração, na região abdominal que apresentava um edema evidente.	Patel et al. (2020)
	Fet Test./ AO/ Enzimas antioxidantes	<i>Trachyspermum ammi</i>	Edema de pericárdio e de saco vitelínico, inibição da eclosão, malformação craniofacial. As células apoptóticas foram encontradas nas regiões do coração e dos olhos. Além disso, foi relatado um aumento significativo da expressão dos níveis de SOD-1 e CAT, nas larvas dos tratamentos, com extrato de <i>Trachyspermum ammi</i> de maneira dependente da concentração, em comparação ao controle. Esse resultado sugere que o extrato de <i>T. ammi</i> ocasiona a geração de radicais nos embriões, ativando as enzimas antioxidantes.
Fet Test./ AO/ Enzimas antioxidantes	Frutos de <i>Carpesii</i>	Edema de pericárdio e de saco vitelínico, inibição da eclosão, redução do comprimento do corpo, presença de células apoptóticas na área do coração e fígado. Também foram relatadas atividades reduzidas da SOD e um aumento para as enzimas CAT e GPX. Esse resultado indica que a SOD estava subregulada e o organismo tentou eliminar o excesso de EROs, aumentando a atividade das outras enzimas.	Xia et al. (2017b)

Tabela 3 - Toxicidade e atividade antioxidantes de extratos vegetais em embriões/ larvas de zebrafish.

(Conclusão)

	TESTES	PLANTAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Toxicidade	Fet Test.	<i>Cucumis callosus</i> e <i>Libidibia ferrea</i>	Edema de pericárdio e de saco vitelínico, inibição da eclosão, curvatura da coluna.	Panda et al. (2018) e Ferreira et al. (2019)
	AO	<i>Euphorbia kansui</i>	Presença de células apoptóticas na área do coração ou fígado.	Zhao et al. (2019)
	Fet Test. / AO	<i>Ligusticum chuanxiong</i> e <i>Acanthopanax koreanum</i>	Os extratos de ambas as plantas atenuaram parcialmente a incidência de mortalidade e edema de pericárdico nos embriões expostos a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Além disso, inibiram a peroxidação lipídica e morte celular induzidas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Wang et al. (2019) e Kang et al. (2015)
Antioxidante	Fet Test.	<i>Rhus coriaria</i>	O pré-tratamento de embriões, com baixas concentrações da fração do extrato de acetato de etila de <i>Rhus coriaria</i> , os protegeu da toxicidade induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , com redução da taxa de mortalidade.	Najjar et al. (2017)
	Fet Test. / Enzimas antioxidantes	<i>Ulva rigida</i>	O pré-tratamento de embriões, com diferentes concentrações do extrato, os protegeu da morte induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aumentando as taxas de sobrevivência, além de reduzir a atividade da SOD e CAT nos animais expostos ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Bourguiba et al. (2017)
	Enzimas antioxidantes	<i>Salvia plebeia</i>	Após indução de estresse oxidativo por LPS, embriões/ larvas, tratadas com o extrato, apresentaram níveis reduzidos de EROs e uma inibição das atividades enzimáticas de SOD e CAT de forma dependente da dose.	Xiong et al. (2019a)

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: EROS-Espécies reativas de oxigênio; AO- laranja de acridina; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de hidrogênio, SOD- superóxido desmutase, CAT- catalase; GPX- glutatona peroxidase; LPS- lipopolissacarídeo.

#### 2.4.1.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A atividade neutrofílica descontrolada e o recrutamento de neutrófilos, em excesso, para os locais inflamatórios, podem levar à inflamação persistente, dano tecidual e doença. Portanto estratégias de descobertas de drogas devem ser desenvolvidas, para o tratamento da inflamação, atuando pela eliminação e/ou redução do recrutamento de neutrófilos e macrófagos, inibindo, assim, a produção de EROs e de mediadores inflamatórios (YANG et al., 2018).

Estudos que avaliem a migração de neutrófilos *in vivo* não são possíveis de serem realizados em modelos de roedores (POLEDNIK et al. 2018). Dessa forma, o zebrafish vem sendo utilizado, em estudos que visam compreender a função dos neutrófilos, durante a inflamação e, também, nas pesquisas em busca de drogas que melhorem as doenças com patologias inflamatórias.

O sistema imune inato do zebrafish inclui principalmente neutrófilos e macrófago, as quais podem ser observados em 48 horas após a fertilização (hpf) (DALE et al., 2008; CAO et al., 2019). Os neutrófilos desses animais compartilham semelhanças morfológicas, bioquímicas e funcionais com os neutrófilos de mamíferos, favorecendo sua utilização neste tipo de pesquisa (HENRY et al., 2013).

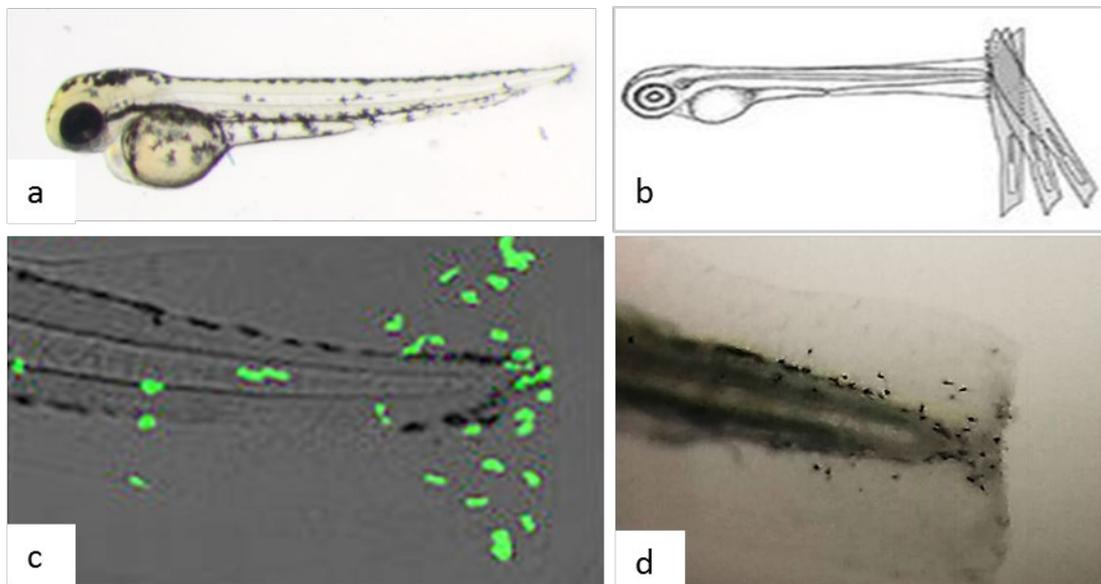
A inflamação no zebrafish pode ser induzida por estímulos biológicos, químicos ou físicos (ZANANDREA, BONAN & CAMPOS, 2020). Durante o estágio larval, é comum induzir lesão física, por meio de ferimento na nadadeira caudal de larvas de 72hpf (FIGURA 5 a-b), sendo posteriormente analisada a migração dos neutrófilos para o local da ferida, com ou sem tratamento prévio com o composto teste (HENRY et al., 2013; YANG et al., 2018; POLEDNIK et al., 2018; ZANANDREA, BONAN & CAMPOS, 2020).

Para a visualização e contagem dos neutrófilos, muitos estudos atuais utilizam marcadores fluorescentes ou animais transgênicos, expressando a proteína verde fluorescente (GFP), em seus neutrófilos (FIGURA 5c) (LI et al., 2018; YANG et al., 2018). Porém, quando não for possível a utilização desse tipo de marcação dos neutrófilos, uma alternativa consiste na utilização de larvas de zebrafish de linhagem selvagem (wildtype), coradas com método de coloração- Sudan Black, após a lesão na cauda (FIGURA 5d). O Sudan Black é um corante lipofílico, que possibilita a marcação dos neutrófilos de uma maneira simples e barata, além de necessitar, para a sua visualização, apenas um estereomicroscópio básico.

A determinação da migração dos neutrófilos em zebrafish, fornecendo base para a identificação dos mecanismos de ação de compostos vegetais com potencial anti-inflamatório,

são documentados em literatura. Uma redução no recrutamento de neutrófilos, em direção ao local da lesão na cauda de maneira dose dependente da concentração e uma aceleração da resolução da inflamação, pela remoção dessas células do local da ferida, é descrito em larvas de zebrafish transgênicas tratadas com um composto isolado de raízes de *Ficus hirta* e um isolado da erva medicinal chinesa -*Marsdenia tenacissima* (LI et al., 2018; YANG et al., 2018). O emprego do método de coloração de Sudan Black foi relatado por Polednik e colaboradores (2018), cujos autores verificaram o efeito anti-inflamatório do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*), sendo observada uma redução de 31 a 21% na migração de neutrófilos, nos animais tratados com o óleo, sendo os resultados consistentes com experimentos anteriores, nos quais o óleo, em concentração muito altas, reduziu significativamente a produção de citosinas pro-inflamatórias, resultando em efeitos anti-inflamatórios (BUKOVSKÁ et al., 2007).

Figura 5 - (a) larva de zebrafish-72hpf; (b) representação esquemática do ferimento na nadadeira caudal; (c e d) migração após ferimento de neutrófilos (c) fluorescentes-marcados com GFP (coloração verde) e (d) corados com Sudan Black (pontos pretos).



Fonte: (b e c) adaptado de Ren et. al. (2015) e (a e d) arquivo pessoal.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Eryngium foetidum*, além de ser um alimento, também possui uma ampla gama de usos etnomedicina, como tratamento de diabetes, reumatismo, vários distúrbios respiratórios, inflamatórios, queimaduras. Seus potenciais terapêuticos são obtidos pela variedade de compostos funcionais presentes nessas plantas. Embora esses relatórios sobre aplicações de *E. foetidum* estejam disponíveis, investigações *in vivo* sobre seus princípios ativos, suas atividades farmacológicas e dados toxicológicos, ainda, são escassos. Dessa forma, os conhecimentos sobre essa espécie devem ser aprofundados e mais estudos realizados, para que os dados sobre essa planta sejam validados com segurança.

Portanto este trabalho fornece uma base científica ao estudo toxicológico, bioquímico e potencial terapêutico, no que diz respeito aos efeitos dos diferentes extratos de *E. foetidum* em zebrafish, buscando novas perspectivas que podem ser úteis para pesquisas futuras.

## REFERÊNCIAS

- ALAFIATAYO, A. A. et al. Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of *Curcuma longa* extract on zebrafish (*Danio rerio*). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- ALAK, G. et al. The protective effect exerted by dietary borax on toxicity metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 216, p. 82-92, 2019.
- ALI, M. K. et al. The protective layer of zebrafish embryo changes continuously with advancing age of embryo development (AGED). **Journal of Toxicology and Pharmacology**, v. 1, n. 2, 2017.
- AROME, D.; CHINEDU, E. The importance of toxicity testing. **Journal of Pharmaceutical and BioSciences**, v. 4, p. 146-148, 2013.
- BARAN, A. et al. Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (Acceptable Daily Intake). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 16-21, 2018.
- BASNET, R. M.; GUARIENTI, M.; MEMO, M.. Zebrafish embryo as an in vivo model for behavioral and pharmacological characterization of methylxanthine drugs. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 596, 2017.
- BERGERON, S. A. et al. Expression profiling identifies novel Hh/Gli-regulated genes in developing zebrafish embryos. **Genomics**, v. 91, n. 2, p. 165-177, 2008.
- BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J. O PROCESSO INFLAMATÓRIO. 2. Componente e Eventos Celulares. 2006. Disponível em <[https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/INFLAM\\_2006.pdf](https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/INFLAM_2006.pdf)>. Acesso em 22 de set. 2020.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010
- BOURGUIBA, I. et al. Antioxidant effect of the marine green alga *Ulva rigida* ethanolic precipitate in yeast cells and zebrafish embryos. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 253-260, 2017.
- BOUZIDI, S. *Eryngium campestre* L.: Polyphenolic and flavonoid compounds; Applications to health and disease. In: **Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease**. Academic Press, p. 69-79, 2018.
- BOUZIDI, S. et al. Investigation of In Vitro Antioxidant Activity and In Vivo Antipyretic and Anti-Inflammatory Activities of Algerian *Eryngium campestre* L. **Current Bioactive Compounds**, v. 13, n. 4, p. 340-346, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Manual de hortaliças não convencionais / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA, p.92, 2010.

BUSSMANN, R.W. et al. Astonishing diversity – the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. **J Ethnobiol Ethnomed**, v.14, n.1, p.43, 2018.

CAO, Z. et al. Exposure to diclofop-methyl induces immunotoxicity and behavioral abnormalities in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 214, p. 105253, 2019.

CARDOZO, E. et al. Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 16, n. 1, p. 33-34, Jan./Feb. 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15, 2013.

CASSAR, S. et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95-118, 2019.

CELIK, B. Ö. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic effects of four Turkish species of *Eryngium* L. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 48, n. 2, p. 271-278, 2019.

CHAKRABORTY, C. et al. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 2, p. 116-124, 2009.

CHARLIE-SILVA, I. et al. Potential of mucoadhesive nanocapsules in drug release and toxicology in zebrafish. **PLoS ONE** 15 (9): e0238823, 2020.

CHATTERJEE, A.; GUPTA, S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. **Cancer letters**, v. 433, p. 33-42, 2018.

CIANFAGLIONE, K. et al. Cytotoxic essential oils from *Eryngium campestre* and *Eryngium amethystinum* (Apiaceae) growing in central Italy. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 7, p. e1700096, 2017.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In: RA, G. (Ed.), CRC handbook of methods in oxygen radical research. **CRC Press**, Boca Raton, FL, p. 283–284, 1985.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.

CONEA, S. et al. Effects of *Eryngium planum* and *Eryngium campestre* extracts on ligature-induced rat periodontitis. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 10, n. 2, p. 693-704, 2015.

CRUVINEL, W. M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DA SILVA, V.A. et al. Levantamento do cultivo do coentrão (*Eryngium foetidum* L.) nas áreas produtoras de Cáceres-MT. **Revista Cultivando o Saber**, v. 9, n. 1, p. 62-72, 2016.

DA SILVA, I.A.; CAMPELO, L.H. de B.P; PASDILHA, M. do R. de F.; SHINOHARA, N.K.S. Mecanismos de resistência das plantas alimentícias não convencionais (PANC) e benefícios para a saúde humana. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agronômicas**, v.15, p.77-91, 2018.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.

DE LA PAZ, J.F et al. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. **Int. J. Mol. Sci.** v.18, p.710, 2017.

DI TIZIO, A. et al. Traditional food and herbal uses of wild plants in the ancient South-Slavic diaspora of Mundimitar/Montemitro (Southern Italy). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 1, p. 21, 2012.

DONG, M. et al. Toxic effects of 1-decyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Chemosphere**, v. 91, n. 8, p. 1107-1112, 2013.

EID, J. I.; DAS, B. Molecular insights and cell cycle assessment upon exposure to chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom polysaccharides in zebrafish (*Danio rerio*). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

ERDEM, S.A. et al. Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 53, 2015.

FARRERA, C.; FADEEL, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 5, p. 2647-2656, 2013.

FERREIRA, D. Q. et al. *Libidibia ferrea* (jucá), a Traditional Anti-Inflammatory: A Study of Acute Toxicity in Adult and Embryos Zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, p. 175, 2019.

FRASCO, M.F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, n.2, pp.149–156. 2002.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** **2000**, v. 63, n. 1, p. 149-164, 2013.

FOKIALAKIS, N. et al. Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 1, p. 38-45, 2007.

GARCIA, G. R.; NOYES, P. D.; TANGUAY, R. L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 161, p. 11-21, 2016.

GARCIA, M.D. et al. Topical anti-inflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute animal models. **Phytother Res**, v.13, p.78-80, 1999.

GEERING, B. et al. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Trends in immunology**, v. 34, n. 8, p. 398-409, 2013.

GERNEZ, Y.; TIROUVANZIAM, R.; CHANEZ, P. Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how?. **European Respiratory Journal**, v. 35: p. 467-469, 2010.

GOMES, R. F. et al. Production chicory Amazon cultivated under density planting and pruning of floral tassel. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 3, p. 9-14, 2013.

GU, J. et al. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 217, p. 629-635, 2019.

HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Method. Enzymol**, v.77, 398–405, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HASEGAWA, T. et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 $\beta$  is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. **Elife**, v. 6, p. e22716, 2017.

HAWAS, U. W et al. Anti-Alzheimer, Antioxidant Activities and Flavonol Glycosides of *Eryngium campestre* L. **Current Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 188-195, 2013.

HENRY, K. M. et al. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 4, p. 633-642, 2013.

HOO, J. Y. et al. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research. **BioMed research international**, v. 2016, p. 20, 2016.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498, 2013.

HUANG, R. et al. Evaluation of the synergetic effect of Yupingfeng san and Flos Sophorae Immaturus based on free radical scavenging capacity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, p. 110265, 2020.

- JAKUBCZYK, K. et al. Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. **Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 48, n. 284, p. 128-132, 2020.
- JANWITTHAYANUCHIT, K. et al. A 24-Weeks Toxicity Study of *Eryngium foetidum* Linn. Leaves in Mice. **Toxicological research**, v. 32, n. 3, p. 231-237, 2016.
- JARADAT, N. A. Novel serial extraction method for antibacterial and antifungal evaluations of the entire *Eryngium campestre* L. plant from Jerusalem/Palestine. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 905-913, 2015.
- JI, M. et al. Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species—A Review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 917, 2020.
- KANG, M. et al. Antioxidant activity of polysaccharide purified from *Acanthopanax koreanum* Nakai stems in vitro and in vivo zebrafish model. **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 38-46, 2015.
- KANG, M.C. et al. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 950-955, 2013.
- KARTAL, M. et al. Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. **Journal of natural products**, v. 69, n. 7, p. 1105-1108, 2006.
- KAWAKAMI, A.; FUKAZAWA, T.; TAKEDA, H.. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 231, n. 4, p. 693-699, 2004.
- KELEN, M. E. B.; NOUHUYS, I. S. V.; KEHL, L. C.; BRACK, P.; SILVA, D.B. Plantas alimentícias não convencionais (PANCs): hortaliças espontâneas e nativas. UFRGS, Porto Alegre, 2015.
- KHODAIE, M.; GHASEMI, N.; RAMEZANI, M.. Green synthesis of silver nanoparticles using (*Eryngium Campestre*) leaf extract. **Eurasian Chemical Communications**, v. 1, n. 5, pp. 411-493., p. 441-450, 2019.
- KIKOWSKA, M. et al. Micropropagation of *Eryngium campestre* L. via shoot culture provides valuable uniform plant material with enhanced content of phenolic acids and antimicrobial activity. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, 2016.
- KIM, S. H., SHARMA, C., KANG, S. C. *Ajowan* Oil Potentiates Ros-mediated Teratogenic Effect in Zebrafish Embryos. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n.4, p.883–896, 2017.
- KIM, Y. G. et al. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. **European journal of pharmacology**, v. 602, n. 1, p. 148-156, 2009.

KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I.D. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.63-65, 2008.

KÖKTÜRK, M.; ALAK, G.; ATAMANALP, M. The effects of n-butanol on oxidative stress and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 227, p. 108636, 2020.

KÜPELI, E.; KARTAL, M; ASLAN, S.; YESILADA, E. Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. **Journal of Ethnopharmacology**.. v.30, p.1-6, 2006.

LACKMANN, C. et al. Novel procedures for whole organism detection and quantification of fluorescence as a measurement for oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Chemosphere**, v. 197, p. 200-209, 2018.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v.3, n.1, p.13, 2007.

LE GUYADER D. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. **Blood** , v.111 p.132–141., 2008.

LEISHANGTHEM, S.; SHARMA, L. DINENDRA. Study of Some important Medicinal Plants found in Imphal-East District, Manipur India. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 4, n. 9, p. 1-5, 2014.

LI, J.et al. Tenacissoside H exerts an anti-inflammatory effect by regulating the nf- $\kappa$ b and p38 pathways in zebrafish. **Fish & shellfish immunology**, v. 83, p. 205-212, 2018.

LINGARAJU, D. P. et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf extracts of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 2, p. 4339-4344, 2016.

LIU, S. et al. Resveratrol oligomers from *Paeonia suffruticosa* protect mice against cognitive dysfunction by regulating cholinergic, antioxidant and anti-inflammatory pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112983, 2020.

MALIK, T. et al. Evaluation of Phytochemicals, Antioxidant, Antibacterial and Antidiabetic Potential of *Alpinia galanga* and *Eryngium foetidum* Plants of Manipur (India). **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 5, 2016.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C.A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181-218, 2014.
- MEDBOUHI, A. et al. Essential oil of algerian *Eryngium campestre*: Chemical variability and evaluation of biological activities. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2575, 2019.
- MEDBOUHI, A. et al. Structural elucidation and cytotoxicity of a new 17-membered ring lactone from Algerian *Eryngium campestre*. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3250, 2018
- MEYERS, J. R. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n. 1, p. e19, 2018.
- MÍDIO, A. F. Glossário de toxicologia. São Paulo: Roca, 1992. 95p.
- MILLS, E. L.; O'NEILL, L. A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. **European journal of immunology**, v. 46, n. 1, p. 13-21, 2016.
- MIRONĆZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.
- MURALIDHARAN, S.; MANDREKAR, P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 6, p. 1167-1184, 2013.
- NAJJAR, F. et al. Protective effect of *Rhus coriaria* fruit extracts against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in muscle progenitors and zebrafish embryos. **PeerJ**, v. 5, p. e4144, 2017.
- NEBIJA, F. et al. Chemical characterization and antioxidant activity of *Eryngium campestre* L., Apiaceae from Kosovo. **Macedonian Pharmaceutical Society, Marshal Tito 13b/8, Skopje Macedonia**, p. 23, 2009.
- NISHIMURA, Y. et al. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. **Congenital anomalies**, v. 55, n. 1, p. 1-16, 2015.
- NOGUEIRA, A. F. et al. Embryonic development, locomotor behavior, biochemical, and epigenetic effects of the pharmaceutical drugs paracetamol and ciprofloxacin in larvae and embryos of *Danio rerio* when exposed to environmental realistic levels of both drugs. **Environmental toxicology**, v. 34, n. 11, p. 1177-1190, 2019.
- NUSSLEIN-VOLHARD C, DAHM R. Zebrafish: A Practical Approach. 1st ed. Oxford, United Kingdom: **Oxford University Press**; 2002.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Paris, France: OECD Publishing. <http://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of Inflammatory Diseases. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R733-R740, 2012.

- OSMAN, A. G. M et al. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2007.
- PADILLA, S.; GLABERMAN, S. The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. In: **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. Academic Press, p. 525-532, 2020.
- PAHWA R, JIALAL I. Chronic Inflammation. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2019.
- PANDEY, M. C.; TYAGI, P. Antioxidants and Free Radicals: Human and Food System. **Journal of Critical Reviews**, v. 7, n. 10, p. 753-756, 2020.
- PARLAK, V. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. **Chemosphere**, v. 207, p. 397-403, 2018.
- PARVEEN, I.; TECHEN, N.; KHAN, I. A. Identification of Species in the Aromatic Spice Family Apiaceae Using DNA Mini-barcodes. **Planta Med**, v. 85, p. 139– 144 2019.
- PASCHOAL, V.; GOUVEIA, I.; SOUZA, N. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs): o potencial da biodiversidade brasileira. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional, São Paulo**, v. 33, n. 68, 2016.
- PATEL, P. et al. Selective in vivo molecular and cellular biocompatibility of black peppercorns by piperine-protein intrinsic atomic interaction with elicited oxidative stress and apoptosis in zebrafish eleuthero embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110321, 2020.
- PAUL, J. H. A; SEAFORTH, C. E.; TIKASINGH, T. *Eryngium foetidum* L.: A review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 302-308, 2011.
- PIENIZ, S. et al. In vitro assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 552-559, 2009.
- POLEDNIK, K. M.; KOCH, A. C.; FELZIEN, L. K. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 361-371, 2018.
- PRABHA, S.; ATHOIBI, S.; DSOUZA, M. R. Pharmacognostical evaluation of Spiny coriander (*Eryngium foetidum* L.): A traditional culinary and ethnomedicinal herb. **International Journal of Botany Studies**, v.4, n.4, p.64-70, 2019.
- PROMKUM, C. et al. Anticlastogenic effect of *Eryngium foetidum* L. assessed by erythrocyte micronucleus assay. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 7, p. 3343-3347, 2012.
- RAUNELLI, P. et al. Cytoprotective Effect of the *Eryngium foetidum*" Sacha Culantro" Methanolic Leaf Extract Versus Sodium Fluoride Exposed Mice using the Micronucleus Test and the Comet Assay. **Pharmacognosy Journal**, v. 11, n. 3, 2019.

- REN, D. et al. Melatonin regulates the rhythmic migration of neutrophils in live zebrafish. **Journal of pineal research**, v. 58, n. 4, p. 452-460, 2015.
- RIGHI, N. et al. Thymus algeriensis Bioass & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with *in vitro/in vivo* antioxidant and antibacterial activity. **Food Research International**, p. 109500, 2020.
- RODRIGUES, T. L. M. et al. Physiological performance and chemical compositions of the *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae) essential oil cultivated with different fertilizer sources. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2020.
- RODRIGUES, Eliana. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 295-302, 2007.
- ROSALES, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 113, 2018.
- SADIK, C.D; KIM, N.D; LUSTER, A.D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol**, v.32, p.452-460, 2011.
- SAYED-AHMAD, B.et al. The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. **Industrial crops and products**, v. 109, p. 661-671, 2017.
- SEPANLOU, M. G. et al. Ethnobotanical and traditional uses, phytochemical constituents and biological activities of *Eryngium* species growing in Iran. **Traditional Medicine Research**, v. 4, n. 3, p. 148-159, 2019.
- SEYIDOGLU, N.; AYDIN, C. Stress, Natural Antioxidants and Future Perspectives. In: **The Health Benefits of Foods-Current Knowledge and Further Development**. IntechOpen, 2020.
- SFOGLIA, N. et al. Caracterização da agrobiodiversidade no Vale do Taquari, RS: levantamento florístico, consumo e agroindustrialização de hortaliças não convencionais. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 36, n. 3, p. 26489, 2019.
- SCHMIDT, R.; STRÄHLE, U.; SCHOLPP, S. Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. **Neural Development**, v. 8, n. 1, p. 3, 2013.
- SHABBIR, M. et al. Phytochemical analysis and Evaluation of hepatoprotective effect of *Maytenus royleanus* leaves extract against anti-tuberculosis drug induced liver injury in mice. **Lipids in health and disease**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2020.
- SHAVANDI, M. A.; HADDADIAN, Z.; ISMAIL, M. H. S. *Eryngium foetidum* L. *Coriandrum sativum* and *Persicaria odorata* L.: a review. **Journal of Asian Scientific Research**, v. 2, n. 8, p. 410, 2012.

SILVA, L. F. L. E. et al. Nutritional evaluation of non-conventional vegetables in Brazil. **Anais da academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 2, p. 1775-1787, 2018.

SINGH, S. et al. Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: a traditional culinary and medicinal herb. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 3, p. 453-460, 2013.

SONG, Y. et al. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 905-909, 2009.

SQUID, A. et al. Antioxidant properties and hepatoprotective effect of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **European Food Research and Technology**, p. 1-11, 2020.

SOUZA, K. K. C. de. Potencial antioxidante, mineral, inibitório de enzimas  $\alpha$ -amilase e lipoxigenase e composição centesimal de espécies da família Apiaceae. 2016. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SUCIU, S.; PÂRVU, A. E. Comparative study on the effects of *Eryngium* sp. Extracts in an acute inflammation model in rat. **Ann. RSCB**, v. 17, p. 86-91, 2012.

SUMITHA, K. V. et al. Potential Larvicidal Principles in *Eryngium foetidum* L.(Apiaceae), An Omnipresent Weed, Effective Against *Aedes albopictus* Skuse. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 6, p. 1279-1286, 2014.

SUN, Y. I.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

THOMAS, P. S. et al. *Eryngium foetidum* L. essential oils: chemical composition and antioxidant capacity. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 24, 2017.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 443-452, 2007.

TSHERING, G. et al. Embryotoxicity evaluation of atracylodin and  $\beta$ -eudesmol using the zebrafish model. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 239, p. 108869, 2021.

UDAYA, S. et al. Evaluation of Toxicity and Antioxidant Property of *Cassia fistula* Stem Bark Extracts in Zebrafish. **Journal of Health and Allied Sciences NU**, 2020.

URAL, I. O. et al. In vivo antimalarial activity of methanol and water extracts of *Eryngium thoriifolium* Boiss (Apiaceae Family) against *P. berghei* in infected mice. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 8, p. 1313-1317, 2014.

VAN DEN BRANDHOF, E.-J., MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, 1862-1866, 2010.

- VELKI, M. et al. Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, p. 4, 2019.
- VIANA, M. M. S. et al. Phytochemical composition and antioxidant potential of unconventional vegetables. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 4, p.504-509, 2015.
- XIA, Q. et al. Assay for the developmental toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to zebrafish embryos/larvae. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 71-81, 2017a.
- XIA, Q. et al. A developmental toxicity assay of *Carpesii* Fructus on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology research**, v. 6, n. 4, p. 460-467, 2017b.
- XIONG, G. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & shellfish immunology**, v. 95, p. 399-410, 2019a.
- XIONG, G. et al. Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 549-558, 2019b.
- WALTERS, K. B. et al. Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 1, p. 86-99, 2009.
- WANG, W.; FANG, S.; XIONG, Z. Protective effect of polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong* hort against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in zebrafish embryo. **Carbohydrate polymers**, v. 221, p. 73-83, 2019.
- WANG, X.H., SOUDERS, C.L., ZHAO, Y.H., MARTYNIUK, C.J. Paraquat affects mitochondrial bioenergetics, dopamine system expression, and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere** 191, 106 e 117, 2018.
- WANG, P. et al. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L.(Apiaceae).**Pharmaceutical Crops**, v. 3, p. 99–120, 2012.
- WHITE, R. M. et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. **Cell stem cell**, v. 2, n. 2, p. 183-189, 2008.
- YANG, Y. et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an in vivo zebrafish model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 496, n. 2, p. 763-769, 2018.
- YAN, S. et al. Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 54–60, 2015.
- YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 245-253, 2009.

YAZBEK, P. B. et al. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 310-331, 2016.

YUHLUNG, C. C.; BHATTACHARYYA, M. Practice of Ethno-medicine among the Chothe Tribe of Manipur, North-East India. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 5, n. 3, 2014.

YUMNAMCHA, T. et al. Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium* L. using zebrafish. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-9, 2020.

YUMNAMCHA, T. et al. Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 97, n. 10, p. 1363-1381, 2015.

ZANANDREA, R.; BONAN, C. D.; CAMPOS, M. M. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery. **Drug Discovery Today**, 2020.

ZHAO, C. et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae in vivo. **Phytomedicine**, v. 62, p. 152959, 2019.

ZIEGLER, F. et al. Effects of l-glutamine supplementation alone or with antioxidants on hydrogen peroxide-induced injury in human intestinal epithelial cells. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 6, n. 4, p. e211-e216, 2011.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS****ARTIGO 1 - METHODOLOGIES FOR DETERMINING THE ANTIOXIDANT  
ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS: SYSTEMATIC REVIEW**

Artigo segue as normas do periódico Current Opinion in Food Science, ao qual foi submetido.

\*Este artigo é um versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

## **Methodologies for determining the antioxidant activity of plant extracts: systematic review**

Tássia Flávia Dias Castro<sup>a</sup>, William Franco Carneiro<sup>b</sup>, Sarah Lacerda Fabem<sup>a</sup>, Elisangela Elena Nunes Carvalho<sup>c\*</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. Castro, T.F.D. [tassia\\_fd@hotmail.com](mailto:tassia_fd@hotmail.com); Fabem, S.L. [sarah.fabem@estudante.ufla.br](mailto:sarah.fabem@estudante.ufla.br); Murgas, L.D.S. [lsmurgas@ufla.br](mailto:lsmurgas@ufla.br)

<sup>b</sup>Department of Animal Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. Carneiro, W.F. [willfc14@gmail.com](mailto:willfc14@gmail.com)

<sup>c</sup>Department of Food Sciences, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. Carvalho, E.E.N. [elisangelacarvalho@ufla.br](mailto:elisangelacarvalho@ufla.br)

\* Corresponding author at: Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil. Phone: +55 (35) 3829-1728. E-mail address: [lsmurgas@dmv.ufla.br](mailto:lsmurgas@dmv.ufla.br) (L. D. S. Murgas).

### **ABSTRACT**

**Introduction:** There is a wide variety of methods to assess the antioxidant activity of plant extracts. This review presents a brief current survey of *in vitro* and *in vivo* methods for assessing the antioxidant activity of plant extracts. The different methods of testing antioxidant activity differ from each other in terms of reaction mechanisms, reaction conditions, the way the results are expressed, as well as analyzing the frequency of use of different methods, animal models used, and extraction methods.

**Methods:** Scopus and Science Direct were searched, resulting in 310 articles, as per the authors study criteria, by using keywords (plant extract + antioxidant + *in vitro* + *in vivo*). The research papers accepted for analysis were those published from January to July 2020, to obtain an updated systematic review.

**Results:** According to this review, there are 17 *in vitro* and 13 *in vivo* methods, the most used for the respective measures, DPHH and LPO. Among the extraction media, methanol is the most used. In addition, few studies carried out *in vitro* and *in vivo* tests simultaneously (25%) and, when *in vivo* tests are used (16%), rodents are the most frequently used models.

Conclusions: In summary, this study demonstrated that plants are promising sources of natural antioxidants and that antioxidant activity was evaluated in different ways. Information on the different methods available for determining antioxidant activity in plant extracts can provide reliable information for identifying and characterizing antioxidant compounds and proving their benefits.

**KEYWORDS:** radical scavenger; *In vivo*; *In vitro*. natural antioxidants; antioxidant models

## 1 INTRODUCTION

Oxidation is an essentially biological process, central to the functioning of the living organism for energy production. However, it also leads to the production of reactive oxygen species (ROS), which can result in lipid oxidation, damage to proteins, and even cell death (Huang et al., 2020). Antioxidants play an important role in delaying, preventing, and removing peroxide products and have been used to reduce the impact of oxidative damage (Ruhe and McDonald, 2001).

Antioxidants can be synthetically or naturally. Synthetics are obtained from chemical products, being of low cost, wide bioactivity, and high performance, while naturals, come from the extraction of natural ingredients with the potential to capture free radicals (Yuniarti et al., 2020). However, due to reports on the side effects of using synthetic antioxidants, such as their carcinogenic potential, there has been increasing interest in replacing synthetic antioxidants with natural, effective, and safe biological antioxidants (Chen et al., 2020; da Silva & Paiva, 2012).

Plant extracts are often a mixture of various bioactive compounds, compounds with varying chemical properties and polarities, which leads to various results based on the methodology in use (Khalil et al., 2020). Therefore, the need for different tests to evaluate the antioxidant activity of an extract and especially the selection of the correct method (Abramovič et al., 2017).

There is a wide variety of methods for assessing the antioxidant activity of plant extracts. This review aims to address all of the probable *in vitro* and *in vivo* methods most commonly used today to assess the antioxidant activity of plant extracts, as well as the frequency of their use, extraction methods, and animal models used. Thus, it would provide advantages to researchers in this area, reducing the time to develop methods and literature reviews, since the most recent review addressing this issue dates from the year 2013 (Alam et al., 2013).

## 2 Data acquisition

For this systematic review, Scopus and Science Direct databases were used to identify and obtain research papers, associated to the study of antioxidant activity, using the appropriate words (plant extract + antioxidant + *in vitro* + *in vivo*). The research papers accepted for analysis were those published from January to July 2020, to obtain an updated systematic review. After the removal of duplicates, of non-accessible articles that address aspects beyond the scope of this review, and the screening of relevant titles and abstracts, 111 articles were submitted to a full-text review. Eighty-nine articles met the established inclusion and exclusion criteria. A flowchart illustrating the progress of the selection of studies and the number of articles in each step is shown in figure 1.

## 3 EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN PLANT EXTRACTS

### 3.1 *In vitro* methods

*In vitro* tests, also called chemical and biochemical methods, have the purpose of evaluating the antioxidant activities of compounds or pure fractions of plant extracts.

Due to the different types of free radicals and their varied forms of action on living organisms, there is hardly a simple and universal method by which the antioxidant action can be valued quantitatively and accurately. Thus, the search for faster and more efficient tests has generated a great number of methods for evaluating the activity of natural antioxidants, as discussed below.

#### 3.1.1 DPPH

DPPH (2,2 -diphenyl -1- picrylhydrazyl) is a stable organic nitrogen radical of intense violet color with an absorption spectrum in the range of 515-520nm. When a certain antioxidant substance is added to a mixture containing DPPH, the antioxidant acts as a donor of hydrogen atoms to DPPH, and generating DPPH-H (Chen et al., 2020). This reduction of DPPH is easily measured by spectrophotometry, where, as the antioxidant inactivates the radicals, the intensity of the violet color decreases, and a light-yellow color appears. Thus, the speed of reaction depends on the nature of the antioxidant, and its concentration will influence the amount of DPPH-H formed.

According to De Oliveira et al. (2020), an aliquot of 3.9 mL of a methanolic solution of DPPH (0.006mM) with 100 $\mu$ L of the extract, is kept at room temperature (1h) , protected from light and, after obtaining the absorbance at 517 nm. With the extent of color loss, a

standard (Trolox <sup>®</sup> -6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) is used to define the percentage of inhibition of DPPH . Trolox <sup>®</sup> is a synthetic and water-soluble antioxidant, similar to vitamin E, which is subjected to the same conditions of analysis as the antioxidant (Alam et al., 2013). The antioxidant capacity is expressed as the percentage of inhibition activity (% I) of DPPH radicals, determined as follows (Equation 1):

$$\% I = (Ac - At) / Ac \times 100, \quad (\text{Eq.1})$$

where Ac is the control absorbance and At is the test absorbance (sample).

### 3.1.2 FRAP

FRAP is the method of antioxidant analysis by determining the reduction power of the iron ion. The method directly evaluates the capacity of the antioxidants contained in the sample to reduce the Fe<sup>3+</sup> ion (ferric iron), present in the 2,4,6-tripyridyl-s-triazine complex (TPTZ) to complete ferrous Fe<sup>2+</sup> (ferrous ion) at acid pH (3,6) (Prastiwi et al., 2020). When the reduction occurs, there is a change in the tonality of the reaction mixture, changing from light purple to intense purple, indicating that the higher the absorbance or intensity of the coloration, the higher will be the antioxidant potential of the analyzed sample.

To perform the test, 90  $\mu$ L of distilled water, 900  $\mu$ L of FRAP reagent (0.3 M acetate buffer: TPTZ: FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O = 10:1:1) and 30  $\mu$ L aliquots of the sample is shaken and incubated (37 ° C/30min). The absorbance was obtained at 595 nm. FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub> is used to obtain the standard curve using concentrations ranging from 100 to 1000 mmol/L, and the results expressed in mM of equivalent ferrous ions per kilogram of dry weight or per liter of the sample (Razafindrakoto et al., 2020).

### 3.1.3 ABTS

The determination of the antioxidant activity by the ABTS assay, as well as for the DPPH method, is widely used. In comparison with DPPH, this method has the advantage of being soluble both in aqueous and organic solvents, and therefore allows the analysis of both lipophilic and hydrophilic (Arnao, 2000).

In the methodology developed by Re et al. (1999), the greenish-blue ABTS<sup>+</sup> radical is generated by oxidation of ABTS by potassium persulfate or manganese dioxide . The absorbance is observed by the spectrophotometer read at 743nm (Xiao et al., 2020). When adding an antioxidant to the solution, its hydrogen is captured by the radical ABTS<sup>+</sup>,

promoting the reduction of  $ABTS^+$  to ABTS occurs, decreasing in absorbance, visualized by the reduction of the intensity of the greenish-blue color of the compound.

The ABTS test is obtained using the assay described by Mokale Kognou et al., (2020). A mixture (1: 1; v / v) of ABTS (7 mM) and potassium persulfate (4.95 mM) is prepared and kept for 24 h protected from light at room temperature. Then, 8  $\mu$ l of the radical solution generated by the ABTS are diluted in 72 mL of distilled water, and from this solution, aliquots of 1  $\mu$ l are removed and added to 20  $\mu$ l of the sample. The mixture is protected from light (37°C/10min) and soon after, the reading is performed in a maximum absorption spectrum of 734nm. The results are expressed as  $ABTS^+$  inhibition percentage, as for DPHH (Eq.1), using Trolox <sup>®</sup> as standard, but other standards can also be used as L- ascorbic acid (Mokale Kognou et al., 2020) or gallic acid (Auddy et al., 2003).

### 3.1.4 PHOSPHOMOLYBDENUM (TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY - TAC)

This method, involves an electron transfer mechanism, where the antioxidants (reducing agents) present in the sample, reduce molybdenum Mo (VI) to Mo (V) (Prieto et al., 1999). The Mo (V) then reacts to the sodium phosphate group, forming a phosphomolybdenum complex, which has a green/blue color at acid pH, which is determined at 695 nm (Barbosa and Nueva, 2019). The initial test solution has a yellow color, turning green as the phosphomolybdenum complex is formed.

To calculate the TAC, an aliquot of 1 mL of reagent solutions (28 mM sodium phosphate, 4 mM ammonium molybdate, and 0.6 M sulfuric acid) and 0.1 mL of the extract (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) are placed hermetically sealed tubes and taken to the water bath (95 ° C/90 min). Then, the samples are left at room temperature for cooling and taken for reading on a spectrophotometer at 695 nm. The TAC of each sample is expressed as gallic acid equivalent (50-250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) (Mahendra et al., 2020) or in Trolox<sup>®</sup> equivalent millimoles (Uysal et al., 2017). The percentage of inhibition (%I) is determined according to equation 1 of this document.

### 3.1.5 METAL CHELATING ACTIVITY

Chelation is the binding of molecules to metallic ions. The chelation ferrous ion is estimated using the Carter method (1971), where ferrozine reagent, which, in the presence of the free  $Fe^{2+}$  ion, forms a pink complex. The decrease in absorbance determines the antioxidant potential of the sample, visible by discoloration of the reaction, due to the interruption (decrease) in the amount of  $Fe^{2+}$  ferrozine complex, caused by antioxidant chelators (Dehariya et al., 2020). Thus, the method determines the remaining amount of non-

chelated iron ions in the reaction mixture (Min et al., 2011). That is, the lower the absorbance, or the lower the intensity of the pink coloration, the greater the antioxidant potential and, therefore, the greater the capacity to chelate the iron ions.

In this reaction, in 160  $\mu$ l of distilled water and 20  $\mu$ l of  $\text{FeSO}_4$  (0.3 mM), 50  $\mu$ l of the sample are added. Then, the reaction is started, after incubation at room temperature (5 min), by adding 30  $\mu$ l of ferrozine (0.8 mM). The absorbance measured at 562nm. For the positive and negative control, EDTA (1.0 mg/mL) and distilled water can be used respectively (Lima et al., 2020). The chelating activity is calculated according to equation 1 of this document.

### 3.1.6 ELIMINATION OF NITRIC OXIDE (NO)

The NO elimination capacity is estimated by the Griess method (Green et al., 1982). For the test, the sulphanilic acid present in Griess's reagent is converted by nitrite to a diazone salt under acid conditions, which is instantly complexed with NEDD (1% sulphanilic acid, 2%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , and 0.1% n - (1-naftil) ethylenediamine dihydrochloride) forming a reddish-pink colored product, which can be detected spectrophotometrically at 548 nm (Haida and Hakiman, 2019; Ihami Gülçin, 2012).

As described by JOSHI et al. (2020), 2 mL of sodium nitroprusside (10 mM) is mixed with 500  $\mu$ L of the sample and 500  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (pH 7.4) and incubated (25°C/ 150 min). Then, from this solution, 500  $\mu$ L are removed and added in 1 mL of sulphanilic acid reagent (33% in glacial acetic acid at 20%) and incubated for another 5 min. After incubation, 1 mL of NEDD (0.1% w/v) is mixed and left to stand at room temperature (30 min) before measuring absorbance at 540 nm. The percentage activity of nitric oxide elimination is calculated following equation 1 of this document.

### 3.1.7 CUPRAC

Developed by Apak et al. (2004), CUPRAC is an analysis based on an electron transfer reaction, monitored by a color change when the oxidizing agent is reduced. In this method, the oxidizing agent, chromogenic neocuproin bis-copper (II) of blue color, suffers a reduction of copper (II)  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^+$ , by the action of an antioxidant, forming a yellow-orange complex. This color change is measured with maximum absorption at 450 nm (Romulo, 2020). The concentration of this complex is proportional to the capacity of the antioxidant of the extract to transfer electrons to copper.

According to Lekouaghet et al. (2020), the method is performed on 96-well microplates. In each well 40  $\mu$ L of each sample are added, 50  $\mu$ L of  $\text{CuCl}_2$  (10 mM), 50  $\mu$ L of

neocuproine solution (7.5 mM), and 60  $\mu\text{L}$  of ammonium acetate buffer solution (1 M, pH = 7). Then, the plate is incubated, protected from light (1h at room temperature), and the absorbance obtained at 450 nm. The reduction capacity of the extracts is compared with positive BHA (butyl hydroxyanisole) and BHT (butylhydroxytoluene) controls.

### 3.1.8 HYDROXYL RADICAL (HRS)

There are several methods to determine the ability to capture the hydroxyl radical, one of them, proposed in 1987 by Halliwell and collaborators (1987), known as the deoxyribose test. In this test, a mixture of ferric chloride and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), in the presence of vitamin C (ascorbic acid-AA), form the  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA complex that reacts with hydrogen peroxide when added, forming hydrolyzate radicals. These formed radicals attack the deoxyribose sugar present in the reaction mixture, degrading it in several fragments. Some of these fragments are capable of reacting with thiobarbituric acid (TBA), after heating, under acid conditions, developing a pink chromogen with maximum absorbance at 532nm (Kota et al., 2020). Compounds that can capture hydroxyl radicals prevent the formation of the chromogen, by preventing the degradation of deoxyribose.

The reaction mixture consists of the preparation of 1.0 mL containing: 100  $\mu\text{L}$  of 2-deoxy-2-ribose 2.8 mM (in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 20 mM buffer, pH 7.4); 500  $\mu\text{L}$  of the samples, 100  $\mu\text{L}$  of ascorbic acid (100  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mM) and 200  $\mu\text{L}$  of the mixture of 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{FeCl}_3$  and EDTA 100  $\mu\text{M}$  (1:1 v/v) which will be incubated (37  $^\circ\text{C}$ / 1 h). Aliquots of 500  $\mu\text{L}$  of the above mixture will be added to 1.0 mL of  $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$  (2.8%) (trichloroacetic acid) and the same volume of TBA (1%), followed by incubation (90  $^\circ\text{C}$ / 20 min). After cooling, the absorbance is read at 532 nm. Ascorbic acid is a positive control [34]. The percentage of radical elimination is calculated following equation 1 of this document.

### 3.1.9 HYDROGEN PEROXIDE ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

The determination of the capacity of plant extracts to eliminate  $\text{H}_2\text{O}_2$  is obtained based on the method of Ruch et al. (1989). Its elimination is necessary because peroxide can damage cells by its ability to easily penetrate their membrane and once inside the cell, in the presence of metal ions, it is converted to the highly toxic hydroxyl radical (OH) (Jafri et al., 2017).

As described by Deghima et al. (2020), the first 0.50 mL aliquots of the sample are diluted in PBS (pH 7.4) and added to 1 mL of 20  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  solutions prepared on the spot. Then, the mixture is incubated protected from light for 10 min and, subsequently, the

absorbance is obtained at 240nm. The percentage of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal is calculated according to equation 1 of this document.

As a positive control, ascorbic acid, rutin, BHA (Jayaprakasha et al., 2002), tocopherol (Gulcin et al., 2003) or quercetin (Ruch et al., 1989) are used and for the negative, it is sufficient to replace the samples by adding PBS instead (Deghima et al., 2020).

### **3.1.10 OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY (ORAC)**

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) is based on the initial work of Ghiselli et al. (1995) and Glazer (1990). The principle of this assay is the ability of antioxidant compounds to eliminate peroxy radicals, generated by the spontaneous decomposition of APPH (2,2-azobis 2-amidopropane dihydrochloride) in an aqueous buffer (Romulo, 2020). To measure the ability of the antioxidant against the peroxy radical, a fluorescent marker (fluorescein) is added to the solution and it competes kinetically with the antioxidants for the peroxy radical. When the peroxy radical reacts with the fluorescent probe, it is reduced in fluorescence. When the tested solution contains antioxidant properties, fluorescent reduction is inhibited (Morena et al., 2019). Thus, the inhibition of fluorescence reduction is proportional to the antioxidant activity, that is, the lower the fluorescence, the same analyzed has less antioxidant activity.

According to Bobinaitè et al. (2020), to perform the ORAC, 25 µL of the sample are added to 150 µL of fluorescein solution (14 µmol/L PBS) in a 96-well black microplate and incubated (37°C/15 min). Soon after, 25 µL of AAPH solution (140 µmol/L of PBS) is added. Fluorescence is recorded every minute for 150 minutes with excitation and emission of 485 and 520nm, respectively, using a 37°C plate reader. The reduction of fluorescence due to radical attack and antioxidant protection results in a fluorescence decay curve (AUC). The final calculation of the results is made considering the difference in the area curves under decay between the white and the sample and/or a pattern that is usually Trolox® (TE). ORAC values are expressed in mg TE/ g of dry weight of the sample.

### **3.1.11 β - CAROTENE/ LINOLEIC ACID**

The method is based on the initial work of by Marco (1968) and modified by Miller (1971), who approach that, during the oxidative degradation of linoleic acid in lipid emulsion or oxidizing agents, free radicals are generated and these initiate the oxidation of β-carotene of orange-red color, leading to discoloration. In this system, the capacity of a certain antioxidant substance to prevent/inhibit discoloration (oxidation) of β-carotene (Lekouaghet

et al., 2020) is evaluated. Thus, the stronger the antioxidant, the lower the degradation rate of  $\beta$ -carotene, the greater the delay in discoloration (Merghem and Dahamna, 2020).

According to the methodology described by Deghima et al. (2020), first, the emulsion of  $\beta$ -carotene should be prepared, which consists of a mixture of 0.5 mg of  $\beta$ -carotene, 25  $\mu$ L of linoleic acid, 1 mL of chloroform and 200 mg of Tween® 20. Then, the mixture is heated to 40 ° C to evaporate the chloroform, 100 mL of distilled water saturated with oxygen is added and the solution is subjected to vigorous stirring to form a stable emulsion. Of the total volume obtained, 2.5 mL of this mixture is used, added to 350  $\mu$ L of the sample to perform the test. The absorbance at 470 nm is measured after 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h, and 48 h of incubation at room temperature protected from light. The inhibition of the bleaching of  $\beta$ -carotene after 24h is calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition (24 h)} = (AE / AB) * 100 \quad (\text{Eq.2})$$

where the absorbance AE in the presence of the extract or patterns at 0 o'clock and AB in the presence of the sample extracts or patterns after 24 hours.

BHA, BHT and gallic acid (Deghima et al., 2020), vitamin C (Alam et al., 2013) or catechin (Jayaprakasha et al., 2002) can be used as positive controls and water and methanol (Deghima et al., 2020; Lekouaghet et al., 2020) can be used as negative controls.

### 3.1.12 THIOBARBITURIC ACID (TBA)

The TBA test is a popular method used to quantify lipid peroxidation. Lipid oxidation proceeds through a free radical chain mechanism that results in many end products, among them, aldehydes are the most prominent (Ghani et al., 2017). The most studied aldehyde as a biomarker for cell membrane damage and corresponding to the final product of the peroxidation chain is malondialdehyde (MDA).

There are numerous methods to quantify the MDA, the most common being the reaction of the MDA with thiobarbituric acid (TBA). It consists of the reaction of 2-Thiobarbituric acid (TBA) with malondialdehyde (MDA), which under acid conditions and at high temperatures react with each other in a 2:1 ratio, forming a pink chromophore with absorption measured by spectrophotometry (Romulo, 2020). The action of antioxidants delays the formation of MDA, reducing the absorption.

According to Mbaoji et al. (2020), the TBA method consists briefly of adding 2 mL of TBA (0.67%) and the same volume of newly prepared TCA (20%) to 1 mL of the sample. This mixture is heated in a water bath (100 ° C / 10 min) and after cooling, it is centrifuged (3000 rpm/20 min). The supernatant is collected, and its absorbance read at 532 nm. The

inhibition of lipid peroxidation in percentage is calculated according to equation 1 of this document. Ascorbic acid can be used as a reference standard and Tween® 80 to 7% as control.

### 3.1.13 REDUCING POWER (RP)

This method was initially described by Oyaizu (1986) and reflects the electron donor capacity of the reducing compound. The presence of antioxidants (reducers) in the samples results in the reduction of the  $\text{Fe}^{+3}$  / ferricyanide complex of yellow coloration to ferricyanate ( $\text{Fe}^{+2}$ ). When the ferrous  $\text{Fe}^{+3}$  ion from the  $\text{FeCl}_3$  reagent is added to this reduced product, it leads to the formation of a bluish-green complex (Prussian blue) with a wavelength absorption of 700nm (Senhaji et al., 2020). In this determination, the greater the intensity of the bluish-green color, the greater the absorption, and consequently, the greater the antioxidant activity (Islam and Sultana, 2020). The test is suitable for the determination of the reducing capacity of individual compounds and complex mixtures (Su et al., 2020).

For the test, equal volumes of sample, potassium ferrocyanide (10mg/mL), and phosphate buffer (0.2M) (pH 6.6) are mixed and incubated (50°C/20 min). After this period, the same volume of  $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$  (10%) (trichloroacetic acid) is immediately added and the mixture is centrifuged (3000rpm/10 min). A volume 2 mL of supernatant is mixed with 0.5 of  $\text{FeCl}_3$  (1%) and 2 mL of distilled water. The absorbance is read at 700nm after stirring the mixture. (Deghima et al., 2020; Mahendra et al., 2020).

As a positive control, gallic acid, ascorbic acid, tocopherol, Trolox®, BHA, BHT, quercetin can be used (Chanda and Dave, 2009; Deghima et al., 2020).

### 3.1.14 FERRIC THIOCYANATE (FTC)

The elimination of radicals generated in lipid peroxidation is studied through TBA and FTC tests. The FTC method is used to quantify the hydrogen peroxide present in the initial stage of lipid peroxidation. Peroxides are formed during the oxidation of linoleic acid and act by oxidizing ferric chloride to ferric ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ). The  $\text{Fe}^{3+}$  ions bind to the ammonium thiocyanate, forming a red coloring complex, the ferric thiocyanate (Nurrulhidayah et al., 2019). The more intense the red color, the greater the absorbance and, therefore, the lower the peroxidation inhibition value (Álvarez-Román et al., 2020). The oxidation of linoleic acid and the formation of ferric thiocyanate are slow in the presence of antioxidants, reducing to red color intensity (Moon and Shibamoto, 2009).

According to Mouffouk et al. (2020), initially, incubation is performed for 1 h (40°C), a mixture of aliquots equal to 400 µl of samples (100 µg / mL) and linoleic acid (2.52%) and double of phosphate buffer solution (pH 7.4). After incubation, 100 µl of this initial mixture is added to 5mL of ethanol 70% and 100 µl of ammonium thiocyanate (NH<sub>4</sub>SCN) (30%). After three minutes, 100 µl of ferrous chloride (prepared in hydrochloric acid - 3.5%) is added and the absorbance is measured every 24h for 7 days at 500nm. For the negative control, the same mixtures are used without the sample and using distilled water. The percentage of inhibition of lipid peroxidation is calculated according to the following formula (Equation 3)

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_0/A_1)] \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

where is the absorbance, A<sub>0</sub> of the extract, A<sub>1</sub> of the white (control, without extract).

### 3.1.15 FERRIC-BIPYRIDINE TEST (FBRC)

The ferric-bipyridine test proposed by Naji et al. (2020), consists of a new method for evaluating total antioxidant capacity. The assay consists in the reduction of Fe (III) to Fe (II) by an antioxidant present in a buffer medium with bipyridine. Bipyridine is a partially selective and very sensitive reagent for Fe (II), being formed the stable chelate of Fe (II) - bipyridine of pink color. Its color intensity is monitored spectrophotometrically with absorbance at 535nm, at pH 4 and room temperature. Thus, the lower the intensity of pink coloration, the lower the antioxidant activity, because more Fe (III) is being reduced to the formation of the Fe (II) -bipyridine complex.

To perform the test, first aliquots of 0.04 mL of the sample (10%) are added to 1.0 mL of a solution containing 0.01M of FeCl<sub>3</sub>, 1.0 mL of bipyridine, and 2.0 mL of acetate buffer (0,3M, pH 4.0). The mixture is then diluted to 10 mL of distilled water and the absorbance is observed by the spectrophotometer at 535nm (10 min) (Naji et al., 2020).

This method has the advantages of being simple, inexpensive, reproducible, and easy to perform. Unlike other methods for evaluating antioxidant activity that needs to be performed in the dark, FBRC can be performed in both light and dark. Moreover, the test can be performed in the pH range of 4-6, being much higher than in other tests, where the very acid pH, escapes the simulation of the antioxidant action under physiological conditions.

### 3.2 *In vivo* methods

In other words, tests are carried out evaluating the effect of the extract on the protection of induced oxidative stress, such as with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Huang et al., 2020; Souid et al., 2020) or if it is the extract that causes stress.

The animal models most used in this type of research are rats (Huang et al., 2020; Souid et al., 2020) and mice (Liu et al., 2020; Shabbir et al., 2020). The antioxidant activity of extracts in these animals can be determined in the serum (Huang et al., 2020; Mbaoji and Nweze, 2020), hepatic homogenate supernatant (Ezzat et al., 2020; Santhi and Annapurani, 2020; Souid et al., 2020), brain, skin (Figueiredo et al., 2020; Keugong Wado et al., 2020), intestine (Sebai et al., 2020), kidneys and lungs (Khalil et al., 2020). To obtain the homogenates, the animals are euthanasiated and the tissues are collected, homogenized in potassium phosphate buffer (100mM) (pH 6.4). These homogenates are then centrifuged at 1500g (4°C/ 25min). and the supernatant obtained, collected, for the evaluation of the antioxidant activity (Sajid et al., 2020).

#### 3.2.1 LIPID PEROXIDATION (LPO)

Lipid peroxidation is a phenomenon that normally occurs in living organisms at low levels, but when uncontrolled, it can cause damage and cell death. This is because peroxidation reactions are toxic to cell membranes because they cause disorders in their organization, usually manifested by the alteration of fluidity, integrity, and permeability. Thus, because of the damage caused to the cells *in vivo*, this is a test widely used among antioxidant assays *in vivo* (Gaschler and Stockwell, 2017).

As described in section 3.1.12 of this document, one of the main ways to evaluate lipid peroxidation is through the quantification of malondialdehyde. The *in vivo* methodology for tissue homogenates follows as discussed for *in vitro* analysis, with only a few modifications. For the *in vivo* assay 2.0 mL of tissue homogenate sample is needed and trichloroacetic acid (TCA) is used at 10% concentration (Keugong Wado et al., 2020).

#### 3.2.2 SUPEROXIDE DEMUTASE (SOD)

Superoxide dismutase (SOD) enzymes are metal enzymes that are part of the first line of defense against excessive amounts of reactive oxygen species. They convert anions of free radical superoxide (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) into hydrogen peroxide molecules and are degraded into water and oxygen, thus freeing cells from the risk of oxidation by these radicals (JI et al., 2020). Because the substrate (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) is unstable, SOD activity is mainly determined by indirect and

rapid methods and is also convenient and accessible. One of these methods uses phenazine methosulfate in the presence of NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) and molecular oxygen, generating the  $O_2^{\cdot-}$  radical under non-acidic pH. The superoxide radicals formed when reacting with nitrotetrazolium blue (NBT) produce a purpura/rose color dye (formazan) (De Oliveira et al., 2009).

As described by Sajid et al. (2020), to evaluate the SOD activity of the kidney, liver, and pancreas of rats, the homogenates of these tissues undergo 2 centrifugations, the first for 15 min (15000g) and then for 10min (10g). After the centrifugations, aliquots of 100  $\mu$ L of supernatant are mixed with 800  $\mu$ L sodium pyrophosphate buffer (pH 6.5)( 0.05 mM) and 60  $\mu$ L of 180 mM phenazine methosulfate as substrate. To start the reaction, 200  $\mu$ L of NADH (980  $\mu$ M) are added and the reaction is stopped after 2 min by the addition of 600  $\mu$ L of glacial acetic acid. The color change is recorded by the absorbance at 540 nm. SOD activity is expressed in units/mg of protein.

### 3.2.3 CATALASE (CAT)

Catalase is one of the endogenous antioxidant enzymes, responsible for catalyzing the hydrogen peroxide in water and oxygen, since the peroxide is highly toxic for the cells (Ji et al., 2020).

To measure CAT activity, 35  $\mu$ L of homogenate supernatant, 625  $\mu$ L of phosphate buffer 50mM (pH 5.0), and 100  $\mu$ L of  $H_2O_2$  (5.9 mM) are used. The absorbance is observed by the spectrophotometer after 1 min at 240 nm (Khalil et al., 2020). To determine the catalase activity, the molar extinction coefficient of  $H_2O_2$ , ( $43.6 M cm^{-1}$ ), is used. One unit of catalase activity is equal to 1 mmol of degraded  $H_2O_2$  per minute and is expressed in unit/ mg of protein.

### 3.2.4 GLUTATHIONE PEROXIDASE (GSH-Px)

To measure the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), the methods of spectrophotometry or colorimetry are the most conventional, proposed by Paglia and Vaelentine (Paglia and Valentine, 1967). GSH-Px, as well as catalase, catalyzes the reduction of  $H_2O_2$  in water, preventing the formation of OH radicals (dos Anjos Oliveira Ferreira et al., 2020). During the reduction of  $H_2O_2$  into  $H_2O$ , catalyzed by GPx, the reduced glutathione (GSH) is transformed into oxidized glutathione (GSSG) (Eq. 4). GSSG is converted back to GSH by glutathione reductase (GR) using nicotinamide adenine dinucleotide reduced phosphate (NADPH) (Eq. 5). Although GR does not act directly on the removal of radical

species, it acts in conjunction with glutathione peroxidase, preventing the paralysis of the metabolic cycle of glutathione (Ji et al., 2020; Penha-Silva et al., 2005). The decrease of NADP absorption is proportional to the activity of glutathione peroxidase (Sedaghatfard et al., 2016).



Shabbir and collaborators (2020), describe the analysis of glutathione peroxidase using mice liver samples. For the assay, are used 1.59 mL of 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mL of  $\text{NaN}_3$  (sodium azide) (1Mm) , 0.5 mL of GSH (1 U / mL), 0.1 mL of NADPH (0.2 mM), 0.01 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.25 mM) and 0.1 mL of the supernatant of the liver sample. The GSH-Px activity is determined by converting NADPH to NADPH, recording the absorbance at 340nm per minute for 5 min. The activity of glutathione peroxidase is expressed in mg per protein, applying a molar coefficient of  $6.22 \times 10^{-3} / \text{M} / \text{cm}$ .

### 3.2.5 REDUCED GLUTATHIONE (GSH)

Reduced Glutathione (GSH) is a tripeptide, formed by glycine, glutamate, and cysteine, with a free thiol group, which donates electrons for peroxide reduction, forming oxidized glutathione (GSSG). This molecule performs important cytoprotective functions, resulting from its activities as a reducer and co-factor for some antioxidant enzymes, such as GPx, being its most important function, by protecting cells against the deleterious effects of oxidative stress (Ahmed et al., 2019).

According to Sajid et al. (2020), to 500  $\mu\text{L}$  of homogenates, 600  $\mu\text{L}$  of sulfosalicylic acid (4%) were incubated (1h at  $4^\circ\text{C}$ ). Then, centrifuged (1200g/20min), collected 30  $\mu\text{L}$  of supernatant and added to it 910  $\mu\text{L}$  of 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 9.6) and 60  $\mu\text{L}$  of 200 mM nitrobenzoic acid dithiobis (DTNB). The absorbance reading is performed after 5 min at 405nm and the enzyme activity is expressed as  $\mu\text{M GSH} / \text{g}$  of tissue.

### 3.2.6 REACTIVE SPECIES OF OXYGEN (EROs)

The production of reactive oxygen species (ROS) can be detected using the non-fluorescent compound DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluorescein diacetate), permeable to the cell membrane. It allows the analysis to be performed both on tissue homogenates (Ezzat et al., 2020) and on whole organ or experimental models (Wang et al., 2020). DCFH-DA is

hydrolyzed by intracellular esterases becoming non-fluorescent (DCFH), which is then oxidized by the action of intracellular reactive species, generating the fluorescent compound dichlorofluorescein (DCF) (De Almeida et al., 2008). Thus, the lower the antioxidant activity of the test material (extract), the higher the fluorescence, due to the reduced presence of intracellular reactive species.

LIN et al. (2020) and WANG et al. (2020) used DCFH-DA to measure the intracellular production of EROS in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, after exposure to plant extract. Following these authors, the method is based on the incubation of these worms, treated or not (control) with the extract, being later washed 3X with PBS and transferred to a 96-well black plate in the presence of 25  $\mu$ M of HFDC-DA. The intensity of fluorescence is recorded on a spectrofluorometer with a wavelength 485nm and 530nm (excitation / emission).

When you want to evaluate the production of reactive oxygen species and the analyzed material presents some other type of fluorescent markings, such as green fluorescent protein (GFP), it is recommended the use of the CellROX-Orange probe (Thermo-Fisher Scientific, CA, USA). This cellular permeating dye is not fluorescent while in a reduced state and exhibits bright orange fluorescence by oxidation by EROs, with maximum absorption/emission of  $\sim$  545/565 nm.

Chensom and collaborators (2020), used larvae of the animal model zebrafish (*Danio rerio*) for the induction of reactive oxygen species. For this, a wound is made on the animal's caudal fin with the aid of a needle or scalpel. After 20 min, the larvae are exposed to the CellROX-Orange probe for another 20 min and washed 3X with the growth medium of these animals. The measurement of the EROs is performed using fluorescence microscope images and the fluorescence signals quantified using the software.

### **3.2.7 ELIMINATION OF NITRIC OXIDE (NO)**

The description of nitric oxide and the importance of the evaluation of its elimination capacity by an antioxidant are present in section 3.1.6 of this document.

To assess the nitrite content *in vivo*, tissue homogenates should first be deproteinized by adding 200  $\mu$ L of ZnSO<sub>4</sub> (2%) and 200  $\mu$ L NaOH (0.5 M) to each sample and centrifuged from 12-15 min to 6400g. After centrifugation, 10  $\mu$ L the supernatant is collected and mixed with 1.5 mL of a solution composed of 1% sulfanilamide, 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylendiamine in 2.5% phosphoric acid solution (Griess reagent). This reagent is used as

a blank when reading the reading performed at 570 nm. The standard curve of sodium nitrite is used to estimate the concentration of nitrite in the samples (Sajid et al., 2020).

When cells grow *in vitro*, they are placed in 96-well plates, with equal volumes of incubation medium and Griess reagent, being kept at room temperature (15 min), before reading the plate at 562 nm. The data are expressed in nitrite concentration ( $\mu\text{M}$ ) (Silva-Jara et al., 2020).

### 3.2.8 GLUTATHIONE REDUCTASE (GR)

Glutathione reductase is a flavoprotein that catalyzes the reduction of oxidized glutathione (GSSG) into reduced glutathione (GSH) in the presence of the coenzyme NADPH, as shown in equation 5. GR allows the maintenance of a high rate of GSH/GSSH, necessary for numerous vital functions of cells, such as the detoxification of reactive oxygen species and free radicals, such as the synthesis of proteins and DNA (Ahmed et al., 2019).

According to Shabbir et al. (Shabbir et al., 2020), for measurement of 0.2 mL glutathione reductase of liver supernatant is added to a mixture composed of 1.56 mL of 0.2M potassium phosphate buffer (pH 7.6), 0.1 mL of 0.1 mM EDTA, 0.05 mL of oxidized glutathione (2 mM) and 0.1 mL of NADPH (0.1 mL). The absorbance is observed by the spectrophotometer at 30°C at 340 nm. The GR activity is calculated in terms of nM of NADPH oxidized per minute/ mg of protein, using the molar coefficient of  $6.22 \times 10^{-3} / \text{M} / \text{cm}$ .

### 3.2.9 GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE (GS-t)

Glutathione-S-transferase is a phase II detoxifying enzyme, involved in maintaining cellular integrity, oxidative stress, and protection against DNA damage. It also acts by catalyzing GSH conjugation to a wide variety of electrophilic substrates, neutralizing their electrophilic sites, and making the products more soluble in water, providing cellular detoxification (Chatterjee and Gupta, 2018).

The reaction mixture consists of adding 150  $\mu\text{L}$  tissue homogenate to 720  $\mu\text{L}$  sodium phosphate buffer (0.1 mM) and 150  $\mu\text{L}$  GSH (1 mM). For 5 min at 37 ° C, this mixture is incubated and the reaction begins with the addition of 14.5  $\mu\text{L}$  chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) which will function as substrate. The absorbance is obtained by reading at 340 nm. The activity level of GST is estimated by the molar coefficient of  $9.6 \times 10^{-3} / \text{M} / \text{cm}$  in terms of CDNB conjugate produced per minute/mg of protein (Shabbir et al., 2020).

### 3.2.10 GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE (GGT or $\gamma$ -GT)

Gamma-glutamyl-transferase (GGT) is an enzyme located in the plasma membrane of cells with secretive and absorbing activity. Its main function is related to the extracellular GSH metabolism on the surface of the plasma membrane, allowing the amino acid components of GSH (glutamic acid and cysteinyl-glycine) to be available for its intracellular resynthesis (Pompella et al., 2007). Thus, GGT is considered a component of the cell protection system against oxidative stress.

Following Shabbir et al. (Shabbir et al., 2020), to determine the GGT levels of liver samples, glutamyl-nitroaniline is used as a substrate. An aliquot of 40  $\mu$ L liver supernatant is mixed with 200  $\mu$ L glutamyl-nitroaniline (5 mM), 200  $\mu$ L glycine (20 mM), and 200  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (12 mM) mixed in 185 mM Tris HCl buffer. The mixture is kept at room temperature (15 min) and soon after adding 200  $\mu$ L of trichloroacetic acid (30%) to stop the reaction. The absorbance is read at 400nm and the GGT activity is calculated from nM p-nitroaniline produced per minute per mg/protein, using the molar coefficient of  $1.74 \times 10^{-3} / \text{H} / \text{cm}$ .

### 3.2.11 FRAP; ABTS; DPPH

The FRAP, ABTS, and DPPH assays not only evaluate *in vitro* antioxidant capacity but can also be performed for *in vivo* evaluations.

Ferreira et al. (2020) describe the evaluation of the antioxidant capacity using the ABTS and FRAP tests, measured on the skin of mice. First, the skin is homogenized in KCl (1.15%), centrifuged (1000 g / 10 min / 4 ° C) and the supernatant collected. For the ABTS test, 7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulphate are added to the supernatant and protected from light for 16h, and then diluted with phosphate buffer (pH 7.4) until absorbance of 0.7-0.8 at 730 nm. For the FRAP test, 0.3 mM of acetate buffer (pH 3.6), 20 mM of FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 10 mM of TPTZ in HCl (40 mM) are used. The absorbance is read at 730 nm for the ABTS test or at 595 nm for the FRAP test, after the mixture is maintained protected from light for 6 min. The results are expressed as nmol Trolox / mg of skin.

For the quantification of plasma antioxidant capacity using the DPPH test, a mixture of 25  $\mu$ L of blood plasma and 625  $\mu$ L of DPPH (0.1 M) is prepared and kept at room temperature protected from light for 30 minutes. After this time, the absorbance is quantified at 517nm in a spectrophotometer (Righi et al., 2020).

## 4 RESULTS AND DISCUSSION

This review aimed to compile the most commonly used methods for evaluating the antioxidant activity of plant extracts, both *in vitro* and *in vivo*. Also, we present the frequency with which each method is used, the main extracting media, the most used *in vivo* models, and finally, a survey of the number of works dealing with *in vitro* and *in vivo* analyses, separately or together.

A frequency analysis for the *in vitro* and *in vivo* methods was performed and the results are shown in figure 2. According to our survey, *in vitro*, DPPH, FRAP, ABTS methods are the most used (Fig. 2A). This result was also found in the review of *in vitro* methods for wild plant antioxidant activity (Fierascu et al., 2018). Of the three methods, DPPH is the most reported in the analyzed studies, a result also found in the review performed by Alam et al. (2013). According to Oliveira (2015), DPPH is one of the most widely used methods, being in more than 90% of antioxidant evaluation studies. This is due to the ease, speed, practicality, high sensitivity, and good stability conferred by the test since the DPPH radical does not need to be generated and the reaction system involves only the radical and the antioxidant (Boroski et al., 2015).

Regarding the evaluation of *in vivo* methods, the highest frequencies of use are the tests, LPO, SOD, and CAT (Fig. 2B). Alam and collaborators (2013) also found LPO and CAT as the most used methods, being the LPO the highest frequency. The biological systems find a redox equilibrium, but when a rupture occurs in this equilibrium, due to an accumulation of oxidizing molecules by overproduction or loss of reduction capacity, the accumulated oxidizing agents oxidize molecules, among them lipids, which are the main components of cell membranes (Gaschler and Stockwell, 2017). So, to measure the LPO is to correlate if the organism is or not in redox homeostasis, and from the results define the other evaluation methodologies. The measurement of SOD and CAT is found in many studies because these enzymes together with GSH-Px are responsible for the first antioxidant defense system, balancing the amount of EROs, maintaining the balance in biological systems (Huang et al., 2020).

The yield from the extraction of plant compounds is influenced by the conditions under which the extraction process is carried out. The choice of the part of the plant used, the extraction time, temperature, the degree of processing, and the solvent used is important. The different solvents and their polarities can affect the transfer of electrons and hydrogen atoms, which are key aspects in the extraction of polyphenols and consequently in the antioxidant capacity (Rockenbach et al., 2008). This highlights the importance of selecting the appropriate

solvents and extraction methods to obtain bioactive compounds. In this review, it was found that the solvents most commonly used are methanol, water, and ethanol (Fig 3), corroborating with the findings of Alam et al. (2013). According to these authors, the use of these solvents is due to their excellent polarity, which favors the extraction of polar compounds such as phenolic and flavonoid compounds that are effective antioxidants. As shown in figure 3, methanol is the most used solvent and this is due to its ability to extract the largest number of compounds when compared to nonpolar solvent and to extract polar and nonpolar substances (Adegbaju et al., 2020; Rajan et al., 2020). Besides, methanol has a lower boiling point (64.7°C), for its evaporation from the extract, a lower temperature is required, causing less damage to the extract when compared to ethanol, which has a boiling point of 78.4°C (Adegbaju et al., 2020). According to our survey, water is the second most used extraction solvent (Fig 3). The preference for its use may be due to its easy availability, low cost, and because it is the most used medium for cooking and preparing decoctions (Adegbaju et al., 2020; Bobinaitè et al., 2020).

In figure 4, the frequency of studies evaluating the antioxidant activity of extracts using *in vitro* tests, *in vivo* tests, or both, and the experimental models of *in vivo* tests are discussed. The data regarding the *in vitro* evaluation of the antioxidant potential is higher when compared to *in vivo* (Fig 4A) and these results corroborate the findings of Fierascu and collaborators (2018). According to these authors, the *in vitro* assays still represent an important tool in the primary evaluation of the materials studied, but this scenario must change. It is reported that the results obtained *in vitro* have little or no relevance for living organisms because radicals such as DPPH / ABTS are not present in living organisms and the pH for the FRAP test does not correspond to the physiological pH (Fierascu et al., 2018).

Regarding *in vivo* models, rodents are the most used in this type of research. We believe that this is due to the ease of collecting and obtaining a large volume of blood, to perform biochemical analysis, without the need for euthanasia of the animal, allowing, depending on the research, several collections in the same animal. And, for the ease of administration of extracts by various routes of administration without difficulties and because they represent experimental models of many human pathological conditions.

## CONCLUSION

In summary, this study demonstrated that plants are promising sources of natural antioxidants and that antioxidant activity was evaluated in different ways. This review presents a brief current survey of *in vitro* and *in vivo* methods to assess the antioxidant

activity of plant extracts. The different methods of testing antioxidant activity differ from each other in terms of reaction mechanisms, reaction conditions, and the way the results are expressed. We demonstrate that the methods most used in the evaluation of antioxidant activity are DPPH and LPO for *in vitro* and *in vivo* measurements, respectively, with methanol being the most used extraction medium. In addition, this review demonstrates that rodents are the most used models for assessing antioxidant activity in *in vivo* assays. Moreover, that there are still few works that carry out tests *in vitro* and *in vivo* simultaneously. Information on the different methods available for determining antioxidant activity in plant extracts can provide reliable information for identifying and characterizing antioxidant compounds and proving their benefits.

### Conflicts of interest

The authors have declared that they have no conflict of interests.

### REFERENCES

- Abramovič, H., Grobin, B., Ulrih, N.P., Cigić, B., 2017. The methodology applied in DPPH, ABTS and folin-ciocalteau assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chim. Slov.* 64, 491–499. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3408>
- Adegbaju, O.D., Otunola, G.A., Afolayan, A.J., 2020. Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. *Heliyon* 6, e04086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04086>
- Ahmed, A., Shamsi, A., Jamal Shahwan, M., Amin, F., Bano, B., 2019. Role of phytocystatin in combating metal ion induced conformational alterations in glutathione reductase. *Int. J. Biol. Macromol.* 127, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.055>
- Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Álvarez-Román, R., Silva-Flores, P.G., Galindo-Rodríguez, S.A., Huerta-Heredia, A.A., Vilegas, W., Paniagua-Vega, D., 2020. Moisturizing and antioxidant evaluation of *Moringa oleifera* leaf extract in topical formulations by biophysical techniques. *South African J. Bot.* 129, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.011>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Arnao, M.B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci. Technol.* [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)
- Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., Tripathi, P.C., Seal, T., Mukherjee, B., 2003. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *J. Ethnopharmacol.* 84, 131–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00322-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00322-7)
- Barbosa, G.B., Nueva, M.C.Y., 2019. Antioxidant Activity and Phenolic Content of

- Hornstedtia conoidea (Zingiberaceae). Asian J. Biol. Life Sci. 8, 01–07. <https://doi.org/10.5530/ajbls.2019.8.1>
- Bobinaité, R., Grootaert, C., Van Camp, J., Šarkinas, A., Liaudanskas, M., Žvikas, V., Viškelis, P., Rimantas Venskutonis, P., 2020. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of the extracts isolated from the pomace of rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.). Food Res. Int. 136, 109310. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109310>
- Boroski, M., Visentainer, J. V., Cottica, S.M., Morais, D.R., 2015. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. Curitiba: Appris 141.
- Carter, P., 1971. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). Anal. Biochem. 40, 450–458. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90405-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90405-2)
- Chanda, S., Dave, R., 2009. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. African J. Microbiol. Res. 3, 981–996.
- Chatterjee, A., Gupta, S., 2018. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. Cancer Lett. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028>
- Chen, S., Li, X., Liu, X., Wang, N., An, Q., Ye, X.M., Zhao, Z.T., Zhao, M., Han, Y., Ouyang, K.H., Wang, W.J., 2020. Investigation of Chemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effects of Alfalfa Flavonoids on Growth Performance. Oxid. Med. Cell. Longev. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8569237>
- Chen, X., Liang, L., Han, C., 2020. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. LWT 131, 109769. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109769>
- Chensom, S., Shimada, Y., Nakayama, H., Yoshida, K., Kondo, T., Katsuzaki, H., Hasegawa, S., Mishima, T., 2020. Determination of Anthocyanins and Antioxidants in ‘Titanbicus’ Edible Flowers In Vitro and In Vivo. Plant Foods Hum. Nutr. 75, 265–271. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00813-3>
- da Silva, M.C.A., Paiva, S.R., 2012. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. An. Acad. Bras. Cienc. 84, 609–616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000300004>
- De Almeida, L.M.V., Piñeiro, C.C., Leite, M.C., Brolese, G., Leal, R.B., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2008. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. Neurochem. Res. 33, 8–15. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9399-5>
- De Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Trevisan, M.T.S., 2009. Vegetals as natural sources of antioxidants. Quim. Nova 32, 689–702. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>
- de Oliveira, V.S., Augusta, I.M., Braz, M.V. da C., Riger, C.J., Prudêncio, E.R., Sawaya, A.C.H.F., Sampaio, G.R., Torres, E.A.F. da S., Saldanha, T., 2020. Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. Food Chem. 315, 126274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126274>
- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Gómez-Mejía, E., Madrid, Y., Baali, F., Bedjou, F., 2020. Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity. South African J. Bot. 132, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.036>
- Dehariya, R., Chandrakar, J., Dubey, S., Ojha, K., Dixit, A.K., 2020. Scavenging and metal chelating potential of *Carthamus tinctorius* L. extracts. Curr. Bot. 43–50. <https://doi.org/10.25081/cb.2020.v11.6009>

- dos Anjos Oliveira Ferreira, L., de Paula Barros de Melo, C., Saito, P., Iwanaga, C.C., Nakamura, C.V., Casagrande, R., da Conceição Torrado Truiti, M., 2020. Nectandra cuspidata fraction and the isolated polyphenols protect fibroblasts and hairless mice skin from UVB-induced inflammation and oxidative stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 205, 111824. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111824>
- Ezzat, M.I., Okba, M.M., Ahmed, S.H., El-Banna, H.A., Prince, A., Mohamed, S.O., Ezzat, S.M., 2020. In-depth hepatoprotective mechanistic study of *Phyllanthus niruri*: In vitro and in vivo studies and its chemical characterization. *PLoS One* 15, e0226185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226185>
- Fierascu, R.C., Ortan, A., Fierascu, I.C., Fierascu, I., 2018. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review. *Curr. Opin. Food Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.006>
- Figueiredo, F. de F., Cechinel Filho, V., Damazo, A.S., Arunachalam, K., Colodel, E.M., Ribeiro, M., Venturini, C.L., Oliveira, D.M., Machado, M.T.M., Pavan, E., Paes, R.L., Tenfen, A., Almeida, P.O. de A., Siebert, D.A., Vitali, L., Macho, A., Martins, D.T. de O., 2020. *Sorocea guilleminiana* Gaudich.: Wound healing activity, action mechanisms, and chemical characterization of the leaf infusion. *J. Ethnopharmacol.* 248, 112307. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112307>
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Ghani, M.A., Barril, C., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., 2017. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A., 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 29–36. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00102-P](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00102-P)
- Glazer, A.N., 1990. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* 186, 161–168. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86106-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86106-6)
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Gulcin, İ., Buyukokuroglu, M.E., Kufrevioglu, O.I., 2003. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 34, 278–281. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00042.x>
- Haida, Z., Hakimian, M., 2019. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci. Nutr.* 7, 1555–1563. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O.I., 1987. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165, 215–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90222-3)
- Huang, R., Zhang, Yuning, Zhang, Yanli, Zhang, L., Pei, L., Shu, G., Yuan, Z., Lin, J., Peng, G., Zhang, W., Zhao, L., Shi, F., Fu, H., 2020. Evaluation of the synergetic effect of Yupingfeng san and Flos Sophorae Immaturus based on free radical scavenging capacity. *Biomed. Pharmacother.* 128, 110265. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110265>
- Islam, R., Sultana, B., 2020. Investigation of the Antioxidant Activity in Melon Peel and Seeds (*Cucumis melo*), *Journal of Applied Sciences and Research journal homepage.*
- Jafri, L., Saleem, S., Ihsan-ul-Haq, Ullah, N., Mirza, B., 2017. In vitro assessment of antioxidant potential and determination of polyphenolic compounds of *Hedera nepalensis* K. Koch. *Arab. J. Chem.* 10, S3699–S3706. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.002>

- Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S., Negi, P.S., Sakariah, K.K., 2002. Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: A byproduct from curcumin production. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 828–835. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-9-1013>
- Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., Li, M., 2020. Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species—A Review. *Molecules* 25, 917. <https://doi.org/10.3390/molecules25040917>
- Joshi, P., Yadaw, G.S., Joshi, S., Semwal, R.B., Semwal, D.K., 2020. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal herbs and their polyherbal formulation. *South African J. Bot.* 130, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.031>
- Keugong Wado, E., Kubicki, M., Ngatanko, A.H.H., Léa Blondelle, K.D., Jorelle linda, D., Roland, R.N., Balbine, K., Lamshoeft, M., Assongalem, A.E., Foyet, H.S., 2020. Anxiolytic and antidepressant effects of *Ziziphus mucronata* hydromethanolic extract in male rats exposed to unpredictable chronic mild stress: Possible mechanisms of actions. *J. Ethnopharmacol.* 260, 112987. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112987>
- Khalil, I., Ghani, M., Khan, M.R., Akbar, F., 2020. Evaluation of biological activities and in vivo amelioration of CCl<sub>4</sub> induced toxicity in lung and kidney with *Abutilon pannosum* (G.Forst.) Schltdl. in rat. *J. Ethnopharmacol.* 249, 112395. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112395>
- Kota, P., Seru, G., Panda, J., Sahu, P.K., Palla, M.S., 2020. The pharmacognostic profile and biological potential of traditional medicinal shrub *hibiscus hirtus* L. *Indian J. Pharm. Sci.* 82, 139–148. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.631>
- Lekouaghet, A., Boutefnouchet, A., Bensusi, C., Gali, L., Ghenaiet, K., Tichati, L., 2020. In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract and its fractions from *Leuzea conifera* L. roots. *South African J. Bot.* 132, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.042>
- lhami Gülçin, 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview I lhami Gü lçin. *Arch Toxicol* 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Lima, T.C., Matos, S.S., Carvalho, T.F., Silveira-Filho, A.J., Couto, L.P.S.M., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., Silva, A.M.O., Heimfarth, L., Passos, F.R.S., Gandhi, S.R., Lima, B.S., Silva, F.A., 2020. Evidence for the involvement of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* Sw. (Triana) Leaves (Melastomataceae). *J. Ethnopharmacol.* 259, 112908. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112908>
- Lin, C., Su, Z., Luo, J., Jiang, L., Shen, S., Zheng, W., Gu, W., Cao, Y., Chen, Y., 2020. Polysaccharide extracted from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja enhanced stress resistance in *Caenorhabditis elegans* via *skn-1* and *hsf-1*. *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.023>
- Liu, S., Li, Y., Yi, F., Liu, Q., Chen, N., He, X., He, C., Xiao, P., 2020. Resveratrol oligomers from *Paeonia suffruticosa* protect mice against cognitive dysfunction by regulating cholinergic, antioxidant and anti-inflammatory pathways. *J. Ethnopharmacol.* 260, 112983. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112983>
- Mahendra, C., M., M., G., M., M.S., S., 2020. Biopotentiality of leaf and leaf derived callus extracts of *Salacia macrosperma* Wight. — An endangered medicinal plant of Western Ghats. *Ind. Crops Prod.* 143, 111921. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111921>
- Mbaoji, F.N., Nweze, J.A., 2020. Antioxidant and hepatoprotective potentials of active fractions of *Lannea barteri* Oliv. (Anarcadiaceae) in rats. *Heliyon* 6, e04099. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04099>
- Merghem, M., Dahamna, S., 2020. Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Extracts. *J. Drug Deliv. Ther.* 10, 171–174. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i2.3935>

- Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48, 91–91. <https://doi.org/10.1007/BF02635693>
- Min, B., McClung, A.M., Chen, M.-H., 2011. Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans of Different Color. *J. Food Sci.* 76, C117–C126. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01929.x>
- Mokale Kognou, A.L., Kopa Kowa, T., Pateriya, P., Narayan Pal, P., Mouokeu, R.S., Tchinda Tiabou, A., Agbor Agbor, G., Pawar Singh, R., Ngono Ngane, R.A., 2020. Pharmacological evidence of *Vitex thyriflora*, *Entandrophragma cylindricum*, and *Anonidium mannii* used for the management of inflammation in Cameroon. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 31. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0053>
- Moon, J.K., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Morena, V.P.F., Ibáñez, F., Cabrera, D., Pintado, B., 2019. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en frutos nativos del Uruguay. *INNOTEC* 19, 64–75. <https://doi.org/10.26461/19.02>
- Mouffouk, C., Mouffouk, Soumia, Oulmi, K., Mouffouk, Sara, Haba, H., 2020. In vitro photoprotective, hemostatic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the species *Linaria scariosa* Desf. *South African J. Bot.* 130, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.003>
- Naji, K.M., Thamer, F.H., Numan, A.A., Dauqan, E.M., Alshaibi, Y.M., D'souza, M.R., 2020. Ferric-bipyridine assay: A novel spectrophotometric method for measurement of antioxidant capacity. *Heliyon* 6, e03162. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03162>
- Nurrulhidayah, A.F., Rafi, M., Lukitaningsih, E., Widodo, Rohman, Windarsih, A., 2019. *Food Research* 4 (2) : 286-293 (April 2020) Review on in vitro antioxidant activities of *Curcuma* species commonly used as herbal components in Indonesia. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(2\).163](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(2).163)
- Oliveira, G.L.S., 2015. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 36–44. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_165](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165)
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765>
- Penha-Silva, N., Cunha, G.N., Ferreira, F.A., Coelho, D.P., 2005. Determinação da faixa de referência de glutathione peroxidase no soro de bovinos sadios. *Biosci. J.* 21, 89–93.
- Pompella, A., Corti, A., Paolicchi, A., Giommarelli, C., Zunino, F., 2007.  $\gamma$ -Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr. Opin. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.04.004>
- Prastiwi, R., Elya, B., Hanafi, M., Desmiaty, Y., Sauriasari, R., 2020. The Antioxidant Activity of *Sterculia stipulata* Korth Woods and Leaves by FRAP Method. *Orig. Artic. Pharmacogn J* 12, 236–239. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.36>
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Rajan, M., Rajkumar, G., Farias Lima Guedes, T.J., Chagas Barros, R.G., Narain, N., 2020. Performance of different solvents on extraction of bioactive compounds, antioxidant and cytotoxic activities in *Phoenix loureiroi* Kunth leaves. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*

- 17, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100247>
- Razafindrakoto, Z.R., Donno, D., Tombozara, N., Andriamaniraka, H., Andrianjara, C., Ramanitrahambola, D., Beccaro, G.L., 2020. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antidiabetic Activities of Leaves and Stems of *Uapaca bojeri* Bail. (EUPHORBIACEAE), an Endemic Plant of Madagascar. *Pharmaceuticals* 13, 71. <https://doi.org/10.3390/ph13040071>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Righi, N., Boumerfeg, S., Fernandes, P.A.R., Deghima, A., Baali, F., Coelho, E., Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Baghiani, A., 2020. *Thymus algeriensis* Bioss & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with in vitro/in vivo antioxidant and antibacterial activity. *Food Res. Int.* 136, 109500. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109500>
- Rockenbach, I.I., da Silva, G.L., Rodrigues, E., Kuskoski, E.M., Fett, R., 2008. Solvent influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Cienc. e Tecnol. Aliment.* 28, 238–244. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000500036>
- Romulo, A., 2020. The Principle of Some in vitro Antioxidant Activity Methods: Review, in: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Institute of Physics Publishing, p. 12177. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/426/1/012177>
- Ruch, R.J., Cheng, S., Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10, 1003–1008. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>
- Ruhe, R.C., McDonald, R.B., 2001. Use of Antioxidant Nutrients in the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 363S-369S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719169>
- Sajid, M., Khan, M.R., Ismail, H., Latif, S., Rahim, A.A., Mehboob, R., Shah, S.A., 2020. Antidiabetic and antioxidant potential of *Alnus nitida* leaves in alloxan induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 251, 112544. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112544>
- Santhi, R., Annapurani, S., 2020. Preliminary evaluation of In vitro and In vivo antioxidative and antitumor activities of flavonoid extract of *Tabernaemontana divaricata* leaves in Ehrlich's lymphoma and Dalton's lymphoma ascites model. *J. Cancer Res. Ther.* 16, 78. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_445\\_17](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_445_17)
- Sebai, E., Serairi, R., Saratsi, K., Abidi, A., Amel, Sendi, N., Mohamed, S., Darghouth, A., Wilson, M.S., Sotiraki, S., Akkari, H., 2020. Hydro-Ethanollic Extract of *Mentha pulegium* Exhibit Anthelmintic and Antioxidant Proprieties In Vitro and In Vivo 65, 375–387. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00169-3>
- Sedaghatfard, F., Razavi, S.A., Hedayati, M., Razmi, N., Rahnama, A., 2016. Glutathione Peroxidase Activity Assay with Colorimetric Method and Microplate Reading Format and Comparison with Chemiluminescence Method. *Eur. Online J. Nat. Soc. Sci.* 5, 15–21.
- Senhaji, S., Lamchouri, F., Toufik, H., 2020. Phytochemical Content, Antibacterial and Antioxidant Potential of Endemic Plant *Anabasis aretioides* Coss. & Moq. (Chenopodiaceae). *Biomed Res. Int.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6152932>
- Shabbir, M., Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., Khan, M.R., 2020. Phytochemical analysis and Evaluation of hepatoprotective effect of *Maytenus royleanus* leaves extract against anti-tuberculosis drug induced liver injury in mice. *Lipids Health Dis.* 19, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01231-9>

- Silva-Jara, J., Angulo, C., Macias, M.E., Velazquez, C., Guluarte, C., Reyes-Becerril, M., 2020. First screening report of immune and protective effect of non-toxic *Jatropha vernicosa* stem bark against *Vibrio parahaemolyticus* in Longfin yellowtail *Seriola rivoliana* leukocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 101, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.048>
- Soud, A., Croce, C.M. Della, Pozzo, L., Ciardi, M., Giorgetti, L., Gervasi, P.G., Abdelly, C., Magné, C., Hamed, K. Ben, Longo, V., 2020. Antioxidant properties and hepatoprotective effect of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Eur. Food Res. Technol.* 246, 1393–1403. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03498-9>
- Su, J., Yang, X., Lu, Q., Liu, R., 2020. Antioxidant and anti-tyrosinase activities of bee pollen and identification of active components. *J. Apic. Res.* <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1722356>
- Uysal, S., Zengin, G., Locatelli, M., Bahadori, M.B., Mocan, A., Bellagamba, G., De Luca, E., Mollica, A., Aktumsek, A., 2017. Cytotoxic and Enzyme Inhibitory Potential of Two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and Their Chemical Composition. *Front. Pharmacol.* 8, 290. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00290>
- Wang, L., Chen, Q., Zhuang, S., Wen, Y., Cheng, W., Zeng, Z., Jiang, T., Tang, C., 2020. Effect of *Anoectochilus roxburghii* flavonoids extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Induced oxidative stress in LO2 cells and D-gal induced aging mice model. *J. Ethnopharmacol.* 254, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112670>
- Wang, X., Li, H., Liu, Y., Wu, H., Wang, H., Jin, S., Lu, Y., Chang, S., Liu, R., Peng, Y., Guo, Z., Wang, Xiaohui, 2020. Velvet antler methanol extracts (MEs) protects against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* by SKN-1. *Biomed. Pharmacother.* 121, 109668. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109668>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R., 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Front.* 1, 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Yuniarti, R., Nadia, S., Alamanda, A., Zubir, M., Syahputra, R.A., Nizam, M., 2020. Characterization, Phytochemical Screenings and Antioxidant Activity Test of Kratom Leaf Ethanol Extract (*Mitragyna speciosa* Korth) Using DPPH Method, in: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing, p. 12026. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1462/1/012026>

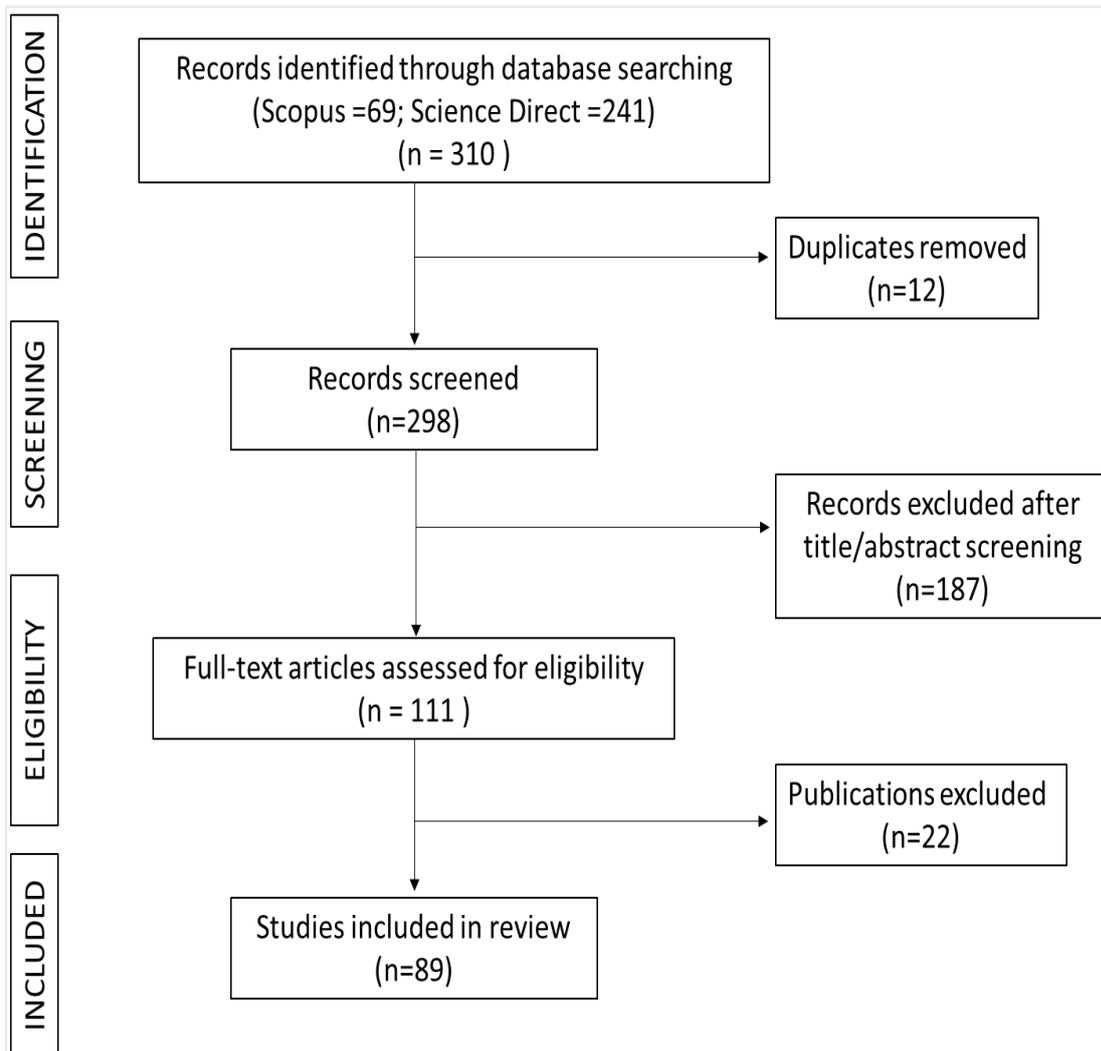


Figure 1. Flowchart of studies included. The studies were excluded according to the following exclusion criteria: review articles, works that did not have the methodologies of investigation of the antioxidant activity (they only brought inferences) and that did not directly evaluate the extract, but products from them, such as nanocapsules, for example.

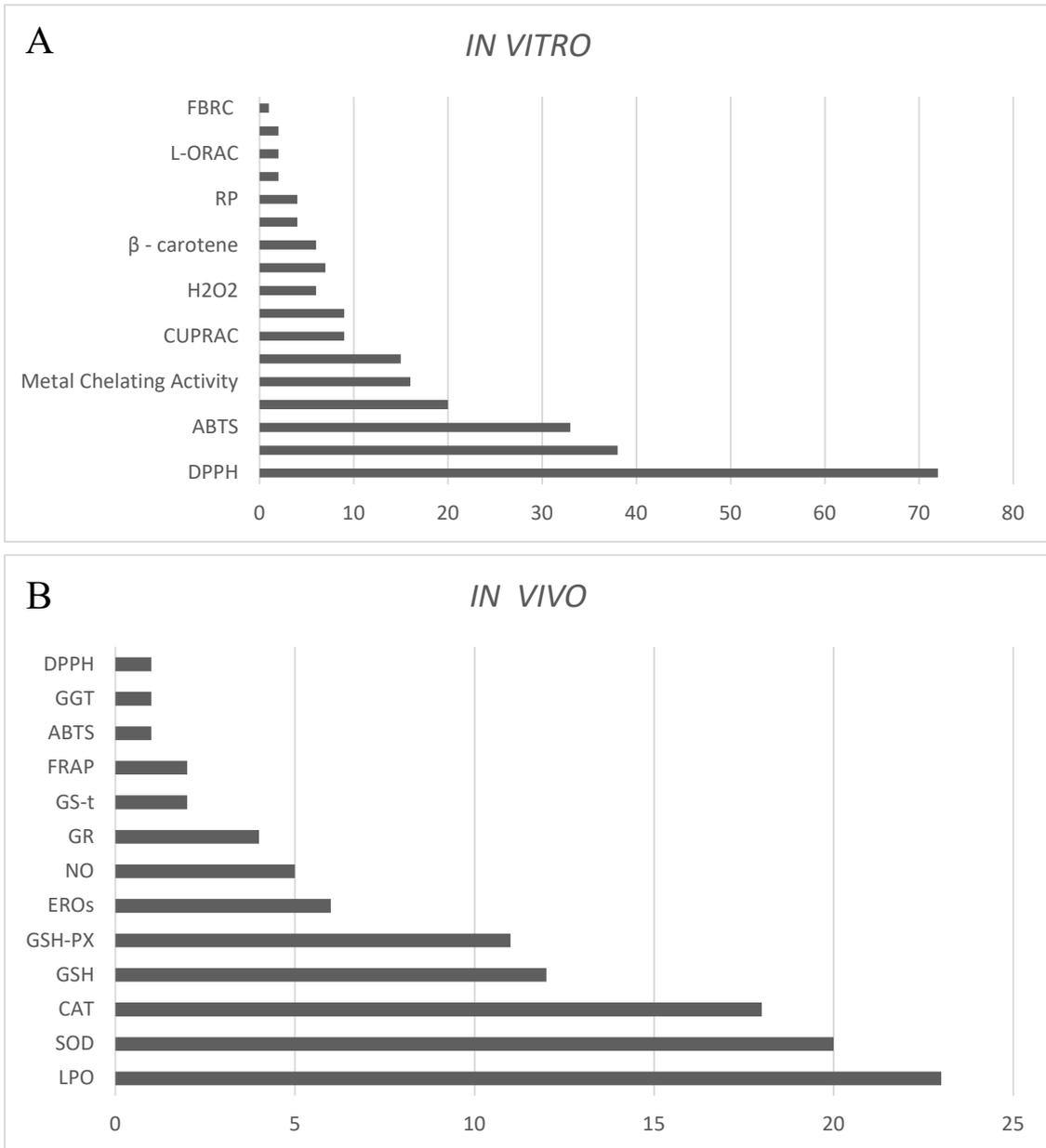


Figure 2. Frequency of the methods of evaluation of the antioxidant activity of plant extracts. (A) *in vitro* (B) *in vivo*.

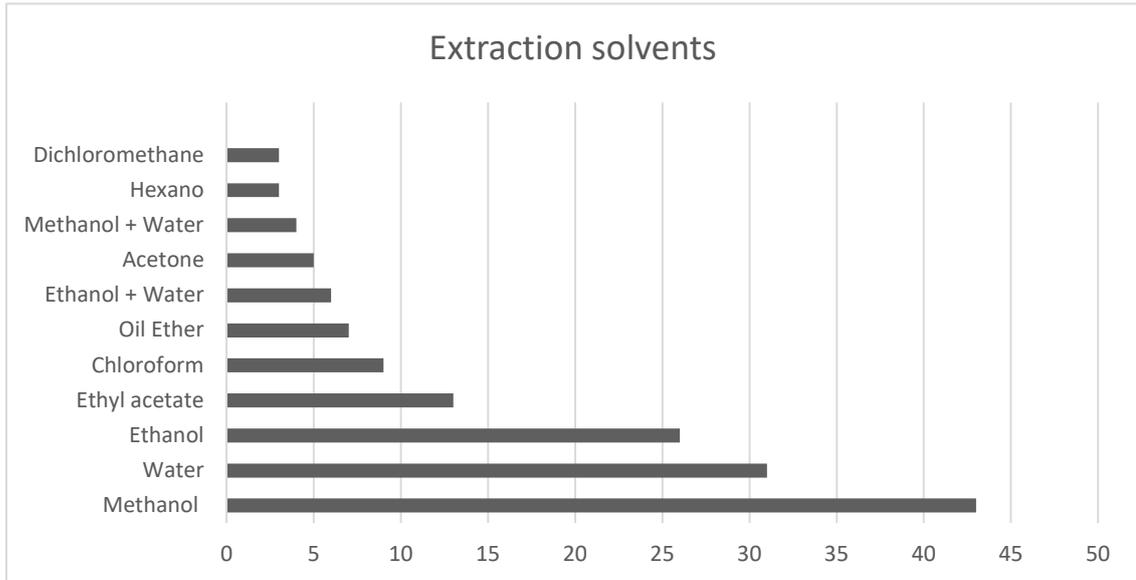


Figure 3. Commonly used extracting solvents for antioxidant study.

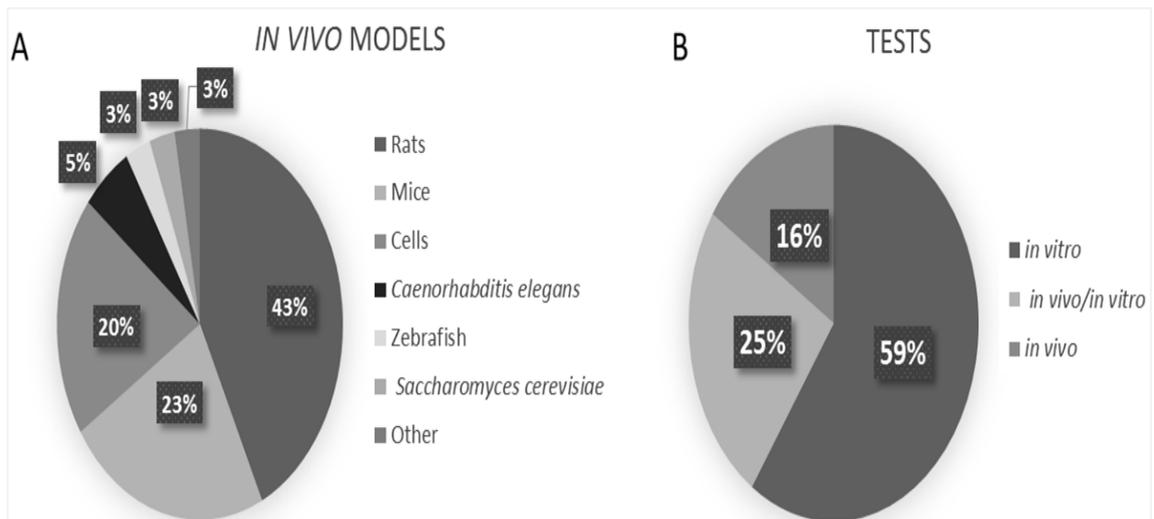


Figure 4. Pie chart plots of frequency analysis. (A) Use of experimental models for *in vivo* tests, to evaluate the antioxidant activity of plant extracts. (B) Studies that address the evaluation of the antioxidant activity of extracts using *in vitro* tests, *in vivo* tests, or both.

**ARTIGO 2- OS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE EXTRATOS DE *Eryngium foetidum*  
EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH SÃO DEPENDENTES DO TIPO DE  
EXTRAÇÃO, DA DOSE E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO**

Artigo segue as normas do periódico Comparative Biochemistry and Physiology- Part C: Toxicology & Pharmacology, ao qual será submetido.

\*Este artigo é um versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

## Os efeitos toxicológicos de extratos de *Eryngium foetidum* em embriões e larvas de Zebrafish são dependentes do tipo de extração, da dose e do tempo de exposição

Tassia Flavia Dias Castro <sup>a</sup>, William Franco Carneiro<sup>a</sup>, Tharyn Reichel<sup>b</sup>, Sarah Lacerda Fabem<sup>a</sup>, Mônica Rodrigues Ferreira Machado<sup>c</sup>, Krisnanda Kelly Castro de Souza<sup>b</sup>, Luciane Vilela Resende<sup>b</sup>, Luis David Solis Murgas <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Jataí, Goiás, Brasil.

\*Autor correspondente: Luis David Solis Murgas

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Campus Universitário, Caixa postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil E-mail: [lsurgas@ufla.br](mailto:lsurgas@ufla.br)

Telefone: +55 35 997411182

### RESUMO

A *Eryngium foetidum* é uma planta herbácea encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Parâmetros farmacológicos *in vivo* comprovam que extratos foliares dessa planta apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e antimicrobiana devido a seus compostos bioativos como flavonoides e fenólicos. Apesar das evidências para várias bioatividades da *E. foetidum*, as informações sobre os perfis de segurança e tolerabilidade são limitadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito e a concentração de diferentes extratos de *E. foetidum* no desenvolvimento de embriões de zebrafish (*Danio rerio*). Para investigar o impacto de extrato aquoso (EA), etanólico (EE) e metanólico (EM), os embriões foram expostos a 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup> até 120 hpf (horas pós fertilização) para avaliação da toxicidade no desenvolvimento embrionário e posteriormente a 0,039; 0,078; 0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup> para respostas antioxidantes das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) e apoptose celular. Os resultados mostraram que, dependendo do solvente de extração, das concentrações utilizadas e tempos de exposição, os extratos de *E. foetidum* ocasionam mortalidade, alteram o tempo de eclosão e promovem mudanças nas atividades enzimáticas. Atrasos no desenvolvimento e aumento da atividade da GST foram encontrados em todos os tratamentos. Não foi observada apoptose em nenhum dos tratamentos. Conclui-se que, concentrações acima de 0,625 mg mL<sup>-1</sup> de EA, EE e EM podem causar efeitos adversos nos estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish.

Palavras-chaves: apoptose, enzimas antioxidantes, desenvolvimento, *Danio rerio*.

## 1 INTRODUÇÃO

*Eryngium foetidum* é uma planta herbácea encontrada em regiões tropicais e subtropicais (CARDOZO et al., 2004). É popularmente conhecida como Chicória-do-Pará, coentro-da-índia, coentro-castelo, coentro-bravo, coentro-da-folha-larga, coentro-japonês, chicória, chicória-de-caboclo, chicória-do-amazonas (GOMES et al., 2013). Seu uso principal é como condimento, mas, seus usos etnomedicinais também são expressivos. A planta inteira ou suas partes são comumente usadas na medicina tradicional como remédios caseiros para o tratamento de diversas doenças, como hipertensão, convulsões, asma, complicações de infertilidade, malária, problemas hepáticos, artrite, entre outras (BUSSMANN et al., 2018; LANS, 2007; LEISHANGTHEM, S.; SHARMA, 2014; MALIK et al., 2016; PAUL et al., 2011; SHAVANDI et al., 2012; YUHLUNG e BHATTACHARYYA, 2014).

Buscando entender a eficiência e as limitações dos bioativos isolados de *E. foetidum* que aumentariam sua abrangência no campo terapêutico, parâmetros farmacológicos *in vivo* comprovaram que os extratos foliares desta planta apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e antimicrobiana, sendo responsáveis por elas, os compostos flavonoides e fenólicos (PRABHA, S.; ATHOIBI, S.; DSOUZA, 2019). A atividade antimicrobiana conferida por terpenóides, glicosídeos, flavonoides, esteroides e tanino, possibilita a sua utilização como agentes antimicrobianos em drogas para a terapia de doenças infecciosas, causadas por patógenos (LINGARAJU et al., 2016). *E. foetidum* também apresenta atividades anticlastogênica e efeito citoprotetor, devido a presença dos compostos ativos terpenóides, fitosteróis, polifenóis e flavonoides, sugerindo que, o seu consumo diário possa gerar benefícios à saúde em termos de proteção a células e seu material genético (PROMKUM et al., 2012; RAUNELLI et al., 2019).

Esses fatos tomados em conjunto, tornam esta planta uma candidata adequada para estudos de exploração de novos fármacos (PAUL et al., 2011). Mas, apesar de possuir vários compostos bioativos, faz-se necessária a avaliação de seus processos de extração, uma vez que, a recuperação de fitoquímicos e a capacidade antioxidante de extratos vegetais é influenciada pelo tipo de solvente utilizado na extração (SINGH et al., 2011; DJERIDANE et al., 2006). Além de avaliar qual o solvente mais eficiente para se obter uma maior recuperação de antioxidantes para seu uso em produtos fitoterápicos, também é necessária a avaliação toxicológica desses produtos naturais. Isso porque, alguns dos seus fitoconstituintes podem ser potencialmente tóxicos, teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos como um composto individual ou em combinação. Portanto, estudar a teratogenicidade ou efeito tóxico

das plantas medicinais utilizando seus potenciais extratos é fundamental (MURUGESU et al., 2019). Dessa forma, garantimos que os compostos sejam seguros para serem expostos à humanos (FALCÃO et al., 2018).

O zebrafish (*Danio rerio*) é hoje um modelo de vertebrado amplamente aceito para estudos de desenvolvimento, biomédicos e para triagem *in vivo* de moléculas bioativas de plantas medicinais (MODARRESI CHAHARDEHI et al., 2020; PHILLIPS and WESTERFIELD, 2014). Estudos utilizando o modelo zebrafish possibilitam a avaliação da toxicidade de compostos bioativos ou extratos brutos de plantas, permitindo a determinação dos processos ideais para a sua obtenção desses materiais vegetais.

Objetivou-se com este estudo, avaliar a toxicidade potencial no desenvolvimento dos estágios embrião-larva de zebrafish, submetidos a diferentes extratos de *E. foetidum*, bem como a atividade biológica destes extratos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA**

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o número de protocolo 014/2019 e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório.

### **2.2 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS**

O material vegetal (partes aéreas das plantas, incluindo flores, folhas e caules) utilizado para a produção dos extratos foi coletado entre as 7 e 9h da manhã, no setor de olericultura localizada no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras-MG. Os extratos vegetais a 10% (p/v) foram preparados empregando-se um sistema de refluxo. Os materiais frescos foram cortados em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> e destilados em solução de água destilada, etanol 70% e metanol 50% por 20 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida, até secagem. Os extratos foram armazenados em freezer a -20 °C até posterior utilização.

### 2.3 CRIAÇÃO DE PEIXES E EMBRIÕES

Adultos de zebrafish de nove meses de idade da linhagem WT, de barbartana curta e de ambos sexos, foram adquiridos no Biotério Central- UFLA. Os animais foram criados e mantidos em racks específicas para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40), mantidos à temperatura de  $28\pm 1^\circ\text{C}$ , alimentados duas vezes ao dia com ração comercial floclada (Alcon basic, Alcon Pet®, SC, BRA) e uma vez com nauplios de artêmia. Peixes machos e fêmeas em uma proporção de 2:1 foram colocados em tanques de reprodução e mantidos no ciclo claro: escuro (14:10) com o acender da luz ao amanhecer para estímulo à desova. Os embriões foram coletados 30 minutos após acasalamento natural, de pelo menos três grupos de matrizes diferentes para evitar variantes do tipo genético. Após lavagem com água, os embriões foram randomizados e transferidos aleatoriamente para placas de Petri, contendo 12mL de meio de cultura de embriões (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,33 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,33 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,33 mM e  $\text{MgSO}_4$  0,33 mM e azul de metileno) (FERREIRA et al., 2019; NUSSLEIN-VOLHARD C, 2002; SIMMONS et al., 2009).

### 2.4 TOXICIDADE NO DESENVOLVIMENTO

Os testes de embriotoxicidade foram baseados nas diretrizes da OECD N ° 236: *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. (OECD, 2013). Para avaliar a toxicidade letal e no desenvolvimento, 20 embriões foram distribuídos em microplacas de 96 poços (1 embrião/poço) contendo 200  $\mu\text{L}$  em cada poço das seguintes concentrações de cada extrato (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10  $\text{mg mL}^{-1}$ ), enquanto o controle continha apenas o meio de cultura de embriões. As concentrações selecionadas para o estudo foram baseadas em dados pré-experimento. Todas as placas foram incubadas em estufa à  $28\pm 1^\circ\text{C}$ .

O desenvolvimento embrionário foi monitorado diariamente às 24, 48, 72, 96 e 120 hpf (horas após a fertilização), utilizando microscópio ótico (modelo Olympus CX22LED) com foco nos parâmetros: coagulação dos embriões, pigmentação do olho e corpo, formação de somitos, presença de batimentos cardíacos e destacamento da cauda, edemas de saco vitelino e do pericárdio e malformações da cauda (OECD, 2013).

## **2.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS**

### **2.5.1 PREPARAÇÃO DE HOMOGENATO**

Para a determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST), inicialmente, embriões após a fertilização foram acondicionados em placas de Petri com 10mL de solução de exposição até atingirem 120hpf. Os estudos de exposição foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a  $28\pm 1^\circ\text{C}$  e, os ovos ou larvas mortos foram removidos diariamente. Posteriormente, foram coletadas 40 larvas/ grupo, homogeneizadas em 400  $\mu\text{L}$  de solução salina tamponada com fosfato (PBS) fria com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 4000 xg a  $4^\circ\text{C}$  por 20 minutos para obtenção dos sobrenadantes (XIONG et al., 2019ab). A concentração de proteínas totais, para cada amostra, foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm, de acordo com o método de Bradford, usando albumina soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

#### **2.5.1.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)**

A avaliação da atividade da SOD foi realizada conforme descrito por Song et al. (2009) com algumas modificações. Para as quantificações, 153  $\mu\text{L}$  do sistema de reação composta por 100  $\mu\text{L}$  de PBS (100 mM, pH 7,8), 2  $\mu\text{L}$  de EDTA (10  $\mu\text{M}$ ), 40  $\mu\text{L}$  de metionina, 11  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 15  $\mu\text{L}$  de NBT (azul de nitrotetrazólio- 1mM) foi preparado e adicionado as microplacas de 96 poços, as quais continham 30  $\mu\text{L}$  da amostra (homogenato das larvas) e 2  $\mu\text{L}$  de riboflavina. Para iniciar a reação, as placas foram colocadas sob luz (400 lux) por 20 min, sendo posteriormente realizadas as leituras da atividade da SOD em espectrofotômetro a 560 nm/  $25^\circ\text{C}$  (TECAN Infinity® M200 PRO, Männedorf, Switzerland). Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de fotorredução do NBT, e o resultado foi expresso como unidades por mg de proteína (SONG et al., 2009; GU et al., 2019). As leituras foram realizadas em triplicatas.

### 2.5.1.2 CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi determinada seguindo protocolo estabelecido por Clairborne (1985). Para a medição, 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do homogenato das larvas diluídos em 140  $\mu\text{L}$  de KPBS (0,05M, pH 7,0) e 150  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (37,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ -30%; 15 mL de KPBS) foram adicionados a microplacas de 96 poços. A diminuição na absorbância foi registrada a 240 nm/ 25 ° C durante 2 min (cada 20 s) em espectrofotômetro (PowerWave XS, Biotek, Winooski, VT, USA). As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata e o nível de atividade da CAT estimado pelo coeficiente de extinção molar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (43,6  $\text{M cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por mg de proteína.

### 2.5.1.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A avaliação da atividade de GST foi determinada de acordo com o protocolo estabelecido por Habig e Jakoby (1981). Para medição, 15  $\mu\text{L}$  do homogenato das larvas, 50  $\mu\text{L}$  de glutathiona reduzida – GSH (25 mM) e 180  $\mu\text{L}$  (1 mM) de 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) (dissolvido em etanol 96% e diluído em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2) foram adicionados a microplacas. Diferenças na atividade da GST foram estimadas pela absorbância obtida em espectrofotômetro a 340 nm por 5 min (TECAN Infinity® M200 PRO Männedorf, Switzerland). As quantificações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em unidade por mg de proteína.

## 2.6 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Para investigar o papel da apoptose na toxicidade dos extratos de *E. foetidum*, realizou-se o método de coloração com laranja de acridina (AO), conforme descrito por Manjunatha et al.(2021). Resumidamente, após exposição de 96 h aos extratos, as larvas foram lavadas duas vezes com o meio de cultura de embriões e coradas com 5 mg / L de laranja de acridina por 20 min, no escuro em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as larvas foram novamente lavadas com o meio de cultura de embriões, anestesiadas com 0,16 mg/mL de tricafina (Sigma Aldrich), observadas e fotografadas em um microscópio de fluorescência, com ampliação de 4X (Axio Observer Z1, Zeiss, Jena, DE). A intensidade da fluorescência das imagens foi quantificada usando o software ImageJ (National

Institutes of Health, NIH) (MANJUNATHA et al., 2021; WANG et al., 2019). Os resultados foram expressos como a mudança percentual no meio de controle.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados de toxicidade, antioxidantes e apoptose foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, em seguida, os dados foram submetidos a Two-Way ANOVA, e teste de Tukey para verificar as diferenças significativas entre os tratamentos. Todos os dados foram analisados com nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ), utilizando o software estatístico Minitab v.19 (State College, PA, USA).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 TOXICIDADE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Os efeitos dos extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e metanólico (EM) de *E. foetidum* nas taxas de sobrevivência dos embriões de zebrafish expostos a 24, 48, 72, 96 e 120h são mostrados na Figura 1. Logo nas primeiras 24h de exposição, nas maiores concentrações testadas (10 e 5 mg mL<sup>-1</sup>) de todos os extratos e na concentração de 2,5mg mL<sup>-1</sup> de EM foi observada uma taxa de 100% de mortalidade. Em contraste, embriões/ larvas expostos a 0,625 mg mL<sup>-1</sup>, apresentaram respostas semelhantes aos embriões do grupo controle ( $p > 0,05$ ), em todos os extratos e tempos analisados. Para as demais concentrações, alterações nas taxas de sobrevivência ocorreram ao longo do tempo (Fig1).

A taxa de eclosão dos embriões expostos aos extratos de *E. foetidum* variaram ao longo do tempo dependendo do extrato e concentrações avaliadas (Fig. 2). Nos tratamentos de 10 e 5 mg mL<sup>-1</sup> de todos os extratos e 2,5mg mL<sup>-1</sup> de EM não foram observadas eclosão em nenhum dos tempos avaliados, como resultado de 100% mortalidade de embriões. Por outro lado, as concentrações de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> nos EA e EE não apresentaram taxa de eclosão a 48 hpf. Resultados semelhantes também foram observados no tratamento 1,25 mg mL<sup>-1</sup> do EA e EM, no qual não foi observada eclosão a 48 hpf.

Em relação as alterações morfológicas, um desenvolvimento normal foi observado em embriões do controle, enquanto um atraso no desenvolvimento foi evidente em todas as concentrações dos extratos (aquoso, etanólico e metanólico) (Fig. 3).

Com os resultados dos estudos preliminares (toxicidade no desenvolvimento embrionário), concentrações abaixo de 0,625 mg mL<sup>-1</sup> foram selecionadas para os experimentos posteriores (atividade enzimática e apoptose celular). Não investigamos os embriões/larvas de 1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup> para análises posteriores devido à toxicidade letal ser muito alta.

### 3.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para caracterizar ainda mais os efeitos nocivos induzidos pelos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *E. foetidum* durante a embriogênese do zebrafish, determinamos as atividades das enzimas SOD, CAT e GST. Como mostrado na figura 4, as atividades da SOD foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que no grupo controle apenas para o extrato aquoso (EA), para embriões/larvas expostos as concentrações de 0,156, 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup> EA. A atividade CAT aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) no EA e EE nas concentrações de 0,039, 0,078, 0,156, 0,0312 e 0,039, 0,156 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em comparação com o controle. As atividades da GST aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle após a exposição aos extratos de *E. foetidum*.

### 3.3. IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Conforme ilustrado na Figura 5(D), a presença de laranja de acridina nos embriões controle demonstra que a morte celular programada é um processo fisiológico normal durante o desenvolvimento. No entanto, a morte celular encontrada nos tratamentos não diferiu do controle (Figura 5 A-C), indicando que os extratos não estavam exercendo qualquer efeito citotóxico nas concentrações indicadas (0,039; 0,078; 0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>) em embriões/larvas de zebrafish.

## DISCUSSÃO

A *Eryngium foetidum* possui uma diversidade de compostos bioativos, os quais são relatados como tendo bioatividades medicas e farmacêuticas (Paul et al., 2011). No entanto, a compreensão de seus perfis toxicológicos é limitada, especialmente no que diz respeito à toxicidade no desenvolvimento embrionário. Não foram encontrados até o momento, na

literatura consultada, nenhum trabalho identificando os efeitos toxicológicos da *E. foetidum* usando embriões/larvas de zebrafish.

Os resultados do presente estudo sugerem fortemente que os extratos aquoso, etanólico e metanólico de *E. foetidum* apresentam toxicidade, pois, afetam a sobrevivência de embriões/larvas de zebrafish, sendo seus efeitos dependentes da dose e do tempo de exposição. A toxicidade *E. foetidum* também foi descrita por outros autores, que revelaram o potencial larvicida de óleo essencial dessa espécie contra o mosquito *Aedes albopictus* (SUMITHA et al., 2014) e em camundongos alimentados com ração suplementada com *E. foetidum* liofilizado, sendo relatado sinais de anormalidades, como lesão renal (JANWITTHAYANUCHIT et al., 2016).

Embriões de zebrafish expostos a concentrações elevadas dos extratos (10, 5, 2,5 mg mL<sup>-1</sup>) resultaram em 100% de mortalidade em 24 h de exposição. Segundo Narko et al. (2020), a mortalidade de embriões de zebrafish nas primeiras horas de desenvolvimento pode ocorrer devido a interferência da substância teste com organelas celulares, como as mitocôndrias. Com essa interferência, o processo de formação de ATP torna-se lento ou interrompido, resultando na falha da membrana ativa da bomba de sódio, acúmulo intracelular de sódio e difusão externa de potássio, podendo ocasionar a morte das células (AZEVEDO et al., 2020; NARKO et al., 2020).

Nas concentrações de 1,25 e 2,5 mg mL<sup>-1</sup> dos extratos de *E. foetidum*, onde nas primeiras 24 h não houve mortalidades, foi possível observar um declínio na sobrevivência embrionária a partir do segundo e/ou terceiro dia de incubação. Esses resultados evidenciam os efeitos de toxicidade dos extratos dependente da dose e tempo de exposição, pois, à medida que o tempo de exposição aumentava, uma diminuição na taxa de sobrevivência foi observada. A exposição prolongada ao extrato pode proporcionar um maior acúmulo de extrato no embrião, atingindo uma concentração que possa induzir toxicidade (ALAFIATAYO et al., 2019) e/ ou ser resultado da camada protetora do embrião (córion) enfraquecida ou danificada (ALI et al., 2017). O córion passa por mudanças contínuas à medida que a idade do desenvolvimento do embrião avança, como alterações no perfil da proteína coriônica. Essas alterações resultam em um aumento na abertura ou ampliação do canal do córion, permitindo um maior influxo de soluto externo (ALI et al., 2017).

Os nossos resultados apontam que o extrato metanólico de *E. foetidum* apresenta uma maior toxicidade para embriões/larvas de zebrafish, quando comparado com extratos aquoso e etanólico. Essa maior toxicidade pode ser devido a capacidade do metanol de extrair um grande número de compostos quando comparado com outros solventes polares (ADEGBAJU

et al., 2020; RAJAN et al., 2020). Ainda, o metanol por apresentar um menor ponto de ebulição (64,7 °C), para a sua evaporação durante o processo de preparação do extrato, são necessárias temperaturas mais baixas, ocasionando menos danos ao extrato se comparado ao etanol e a água, os quais apresentam ponto de ebulição mais elevados (ADEGBAJU et al., 2020).

Entre os extratos avaliados, a menor toxicidade foi encontrada para o extrato aquoso. A maior letalidade de EE e EM nos embriões e larvas de zebrafish pode ocorrer devido a maior presença de taninos nesses extratos. Em estudos realizados por Singh et al. (2013) foi relatada a maior presença de taninos nos extratos de *E. foetidum* quando utilizados solventes etanólicos e metanólicos e menor presença em água. A menor presença de taninos nos extratos aquosos ocorre porque os taninos são perdidos durante o processo de fervura (SINGH et al., 2011; ESENWAH AND IKENEBOMEH, 2008). Os taninos são compostos que apresentam atividade antioxidante (SINGH et al., 2011) mas, seus efeitos negativos à saúde também são relatados como um composto interferente na disponibilidade de ferro e zinco e algumas enzimas digestivas no corpo (BEECHER, 2003). Esse composto químico é considerado tóxico e indesejável nutricionalmente porque precipita proteínas, inibe enzimas digestivas e afeta a utilização de vitaminas e minerais (MONTEIRO et al., 2005). Além disso, a maior ingestão de fontes ricas em taninos também está associada com efeitos carcinogênicos, má utilização de proteínas e toxicidade hepática e renal (AKWAOWO et al., 2000). Nossos achados estão de acordo com Singh et al. (2013), que demonstraram que o extrato aquoso de *E. foetidum* possui baixo teor de tanino e, portanto, possui baixa probabilidade de causar algum efeito negativo a saúde.

Assim como os taninos, os flavonoides também podem ocasionar toxicidade aos organismos. Os flavonoides possuem propriedades antioxidantes ao promover a remoção excessiva de radicais livres, agindo como um agente neutralizante (JIA et al., 2017). Entretanto, dependendo de suas concentrações, os flavonoides podem apresentar propriedades pró-oxidantes, promovendo a oxidação de outros compostos (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011). Estes antioxidantes são facilmente extraídos de *E. foetidum* em meio alcoólico e menos em aquoso, pois temperaturas altas degradam os flavonoides (SINGH et al., 2013; SUPRAJA, P. ; USHA, 2013). Dessa forma, a menor taxa de sobrevivência dos embriões/larvas expostos a EE e EM no presente trabalho, pode ser atribuída às maiores concentrações de flavonoides e taninos nesses extratos em comparação com EA.

As larvas de zebrafish geralmente eclodem do córion entre 48 e 72hpf. A eclosão consiste de uma combinação de mecanismos bioquímicos e físicos que regulam o processo (WANG et

al., 2018). Sabe-se que sinais físicos e químicos detectados pelo embrião ativam a produção da enzima relacionada a eclosão (corionase- HE1), a qual degrada a camada interna do córion e permite que os movimentos espontâneos dos embriões em desenvolvimento proporcionem o evento da eclosão (DE LA PAZ et al., 2017). Alguns trabalhos têm comprovado que, os extratos e óleo de plantas, retardam o processo de eclosão de embriões de zebrafish, como óleo de *Trachyspermum ammi* (Apiaceae), os extratos de Frutos de *Carpesii*, *Piper nigrum* (de pimenta-do-reino) e de *Millettia pachycarpa* (KIM et al., 2017; PATEL et al., 2020; XIA et al., 2017; YUMNAMCHA et al., 2015). Alguns autores atribuem que esse atraso na eclosão possa ser devido a alterações na liberação da enzima corionase e/ou redução dos movimentos das larvas devido a alterações comportamentais, ocasionadas por componentes presentes nessas plantas (KIM et al., 2017; PATEL et al., 2020). O estudo de Cavalcante et al. (2017), sugeriu que os compostos fenólicos são capazes de induzir ou inibir a atividade da enzima corionase, atrasando a eclosão dos embriões. Baseado nestes argumentos, presumimos que, no presente estudo, os atrasos na eclosão dos embriões expostos os extratos de *E. foetidum* também tenham sido ocasionados por esses fatores.

Outra hipótese sobre o retardo da eclosão, está relacionado ao atraso no desenvolvimento dos embriões e a sua incapacidade de romper o córion (OSMAN et al., 2007; YUMNAMCHA et al., 2015). O atraso no desenvolvimento é um fenômeno frequentemente observado em embriões expostos a agentes teratogênicos (VAN DEN BRANDHOF e MONTFORTS, 2010), sendo geralmente considerado como um efeito reversível e inespecífico. Em todos os tratamentos de *E. foetidum* foram encontrados atrasos no desenvolvimento embrionário logo nas primeiras 24hpf. Acreditamos que, devido a elevada toxicidade das concentrações de 1,25 e 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, os embriões tenham conseguido reverter o atraso no desenvolvimento de forma mais lenta, resultando em uma eclosão tardia. Ao contrário 0,625 mg mL<sup>-1</sup> de EE e EM por apresentarem baixa toxicidade, os embriões conseguiram reverter o atraso no desenvolvimento de uma maneira mais rápida, resultando em uma eclosão no tempo esperado.

A atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GST são indicadores importantes da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivada da toxicidade de um composto (MENG et al., 2020). As enzimas superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas que fazem parte da primeira linha de defesa contra quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio. Elas convertem ânions de superóxido de radical livre (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) em moléculas de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posteriormente será degradado em água e oxigênio, pela enzima catalase, livrando assim, as células do risco de oxidação por

esses radicais (JI et al., 2020). Após a exposição de embriões/larvas aos extratos de *E. foetidum*, diferenças significativas em relação ao controle, foram encontradas apenas para a atividade da SOD nos tratamentos de 0,156, 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup> de EA e a CAT para EA e EE nas concentrações de 0,039, 0,078, 0,156, 0,0312 e 0,039, 0,156, respectivamente. Acreditamos que, como as concentrações utilizadas para a determinação da atividade enzimática foram inferiores as utilizadas na avaliação da toxicidade no desenvolvimento, as concentrações de taninos e flavonoides possivelmente estavam baixas. Dessa forma, esses bioativos poderiam estar atuando como antioxidante, realizando a eliminação de ROS, produzidos pelo metabolismo das larvas, de forma direta ou estimulando as enzimas antioxidantes.

As GSTs são enzimas de biotransformação de fase II, que desempenham um papel fisiológico específico na desintoxicação do zebrafish (GLISIC et al., 2015). Elas estão envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e na eliminação de espécies reativas de oxigênio e produtos da lipoperoxidação, atuando por meio da catalisação da conjugação de GSH a uma ampla variedade de substratos, neutralizando seus locais eletrofílicos, tornando-os menos tóxicos, mais solúveis em água, logo, mais facilmente excretados (CHATTERJEE e GUPTA, 2018; ZHU et al., 2011). Um aumento significativo na atividade da GST em larva de zebrafish foi observado em todas as concentrações e extratos analisados em comparação ao controle. Esse aumento pode estar relacionado a presença de flavonoides nesses extratos. Segundo Procházková et al. (2011) e Lee-Hilz et al. (2006), os flavonoides são capazes de induzir enzimas desintoxicantes de fase II, como *NAD (P) H: quinona oxidoreductase*, UDP-glicuronil transferase e a glutathione S-transferase, que são as principais enzimas de defesa contra tóxicos eletrofílicos e estresse oxidativo. Além disso, os flavonóides são xenobióticos típicos para animais e humanos, metabolizados como tal e rapidamente removidos da circulação (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011). Dessa forma, o aumento na atividade da GST nos embriões/larvas expostos aos extratos de *E. foetidum*, pode ser devido ao estímulo de flavonoides presentes nos extratos para eliminar compostos tóxicos ou pela sua própria eliminação como xenobiótico.

A regulação redox e a apoptose desempenham papéis cruciais no processo de desenvolvimento, pois, seus distúrbios podem ocasionar deformidade e morte (WANG et al., 2016). A apoptose pode ocorrer naturalmente durante a embriogênese, regulando muitos processos de desenvolvimento, como morfogênese, remoção de estruturas vestigiais e regulação do número de células ou pode ser resultado de um dano ou estresse celular (SIMMONS et al., 2009; YU et al., 2011, XIA et al., 2017). No presente estudo, a

presença de laranja de acridina nos embriões de controle demonstra que a morte celular programada é um processo fisiológico normal durante o desenvolvimento. E apesar das larvas expostas aos extratos também apresentarem morte celular, estas não diferiram do controle, o que sugere que concentrações abaixo de  $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$  de EA, EE e EM não induzem apoptose em embriões/larvas de zebrafish.

## CONCLUSÃO

Extratos de *Eryngium. foetidum* podem ocasionar toxicidade no desenvolvimento de embriões/ larvas de zebrafish. Essa toxicidade é dependente do solvente empregado na extração, das concentrações utilizadas e tempos de exposição, levando à mortalidade, atrasos no desenvolvimento, no tempo de eclosão e na atividade de enzimas antioxidantes. Com base em nossos resultados, para que os dados dessas plantas sejam validados com segurança, uma investigação mais detalhada com vista a conhecer os mecanismos biológicos afetados pelos extratos, com posterior investigação de seus potenciais antioxidante e anti-inflamatório deve ser realizada.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Rede Mineira de Bioterismo, da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

Adegbaju, O.D., Otunola, G.A., Afolayan, A.J., 2020. Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. Heliyon 6, e04086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04086>

- Akwaowo, E.U., Ndon, B.A., Etuk, E.U., 2000. Minerals and antinutrients in fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook f.). *Food Chem.* 70, 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00207-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00207-1)
- Alafiatayo, A.A., Lai, K.S., Syahida, A., Mahmood, M., Shaharuddin, N.A., 2019. Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of *Curcuma longa* Extract on Zebrafish (*Danio rerio*). *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3807207>
- Ali, M.K., Saber, S.P., Taite, D.R., Emadi, S., Irving, R., 2017. The Protective Layer of Zebrafish Embryo Changes Continuously with Advancing Age of Embryo Development (AGED). *J. Toxicol. Pharmacol.* 1, 009.
- Azevedo, R.D.S., Falcão, K.V.G., Amaral, I.P.G., Leite, A.C.R., Bezerra, R.S., 2020. Mitochondria as targets for toxicity and metabolism research using zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1864, 129634. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129634>
- Beecher, G.R., 2003. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J. Nutr.* 133, 3248S-3254S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3248S>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bussmann, R.W., Paniagua Zambrana, N.Y., Romero, C., Hart, R.E., 2018. Astonishing diversity—the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 14, 43. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0241-8>
- Cardozo, E., Rubio, M., Rojas, L.B., Usubillaga, A., 2004. Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *J. Essent. Oil Res.* 16, 33–34. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698645>
- Cavalcante, A.K., Lopes-Ferreira, M., Rogero, S.O., Rogero, J.R., 2017. Evaluation of resveratrol toxicity in the embryolarval stage of *Danio rerio* fish. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 12, 133–139. <https://doi.org/10.5132/eec.2017.01.15>
- Chatterjee, A., Gupta, S., 2018. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* 433, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028>
- Clairborne, A., 1985. Catalase activity. Greenwald, R.A., Ed., *CRC Handb. Methods Oxyg. Radic. Res.* CRC Press.
- De la Paz, J., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M., Allende, M., 2017. Triazole Fungicides Inhibit Zebrafish Hatching by Blocking the Secretory Function of Hatching Gland Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 710. <https://doi.org/10.3390/ijms18040710>

- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Esenwah, C.N., Ikenebomeh, M.J., 2008. Processing Effects on the Nutritional and Anti-Nutritional Contents of African Locust Bean (*Parkia biglobosa* Benth.) Seed. *Pakistan J. Nutr.* 7, 214–217. <https://doi.org/10.3923/pjn.2008.214.217>
- Falcão, M.A.P., de Souza, L.S., Dolabella, S.S., Guimarães, A.G., Walker, C.I.B., 2018. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 35015–35026. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3399-7>
- Ferreira, D.Q., Ferraz, T.O., Araújo, R.S., Cruz, R.A.S., Fernandes, C.P., Souza, G.C., Ortiz, B.L.S., Sarquis, R.S.F.R., Miranda, J.C.M.M., Garrett, R., Carvalho, J.C.T., Oliveira, A.E.M. de F.M., 2019. *Libidibia ferrea* (jucá), a Traditional Anti-Inflammatory: A Study of Acute Toxicity in Adult and Embryos Zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmaceuticals* 12, 175. <https://doi.org/10.3390/ph12040175>
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 158, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
- Gomes, R.F.A.U.A. no G.S., Silva, J.P. da A.U.A. no G.S., Lopes de Gusmao, S.A.A. no G.S., Souza, G.T. de, 2013. Production chicory Amazon cultivated under density planting and pruning of floral tassel. *Rev. Caatinga* 26, 9–14.
- Gu, J., Zhang, J., Chen, Y., Wang, H., Guo, M., Wang, L., Wang, Z., Wu, S., Shi, L., Gu, A., Ji, G., 2019. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Chemosphere* 217, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.218>
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. pp. 398–405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
- Janwitthayanuchit, K., Kupradinun, P., Rungsipipat, A., Kettawan, A., Butryee, C., 2016. A 24-Weeks Toxicity Study of *Eryngium foetidum* Linn. Leaves in Mice. *Toxicol. Res.* 32, 231–237. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.3.231>
- Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., Li, M., 2020. Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species—A Review. *Molecules* 25, 917. <https://doi.org/10.3390/molecules25040917>
- Jia, S., Shen, M., Zhang, F., Xie, J., 2017. Recent Advances in *Momordica charantia*:

- Functional Components and Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2555. <https://doi.org/10.3390/ijms18122555>
- Kim, S.H., Sharma, C., Kang, S.C., 2017. Ajowan Oil Potentiates Ros-mediated Teratogenic Effect in Zebrafish Embryos. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 20, 883–896. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1383193>
- Lans, C., 2007. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3, 13. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-13>
- Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.-M.J.F., Westphal, A.H., van Berkel, W.J.H., Aarts, J.M.M.J.G., Rietjens, I.M.C.M., 2006. Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1499–1505. <https://doi.org/10.1021/tx060157q>
- Leishangthem, S.; Sharma, L.D., 2014. Study of Some important Medicinal Plants found in Imphal-East District, Manipur India. . *Int. J. Sci. Res. Publ.* 4, 1–5.
- Lingaraju, D. P., Sudarshana, M. S., Mahendra, C., & Rao, K.P., 2016. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf extracts of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). *Indo Am. J. Pharm. Res.* 6, 4339–4344.
- Malik, T., Pandey, D.K., Roy, P., Okram, A., 2016. Evaluation of Phytochemicals, Antioxidant, Antibacterial and Antidiabetic Potential of *Alpinia galanga* and *Eryngium foetidum* Plants of Manipur (India). *Pharmacogn. J.* 8, 459–464. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.5.8>
- Manjunatha, B., Deekshitha, B., Seo, E., Kim, J., Lee, S.J., 2021. Developmental toxicity induced by particulate matter (PM2.5) in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Aquat. Toxicol.* 238, 105928. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105928>
- Meng, Y., Zhong, K., Xiao, J., Huang, Y., Wei, Y., Tang, L., Chen, S., Wu, J., Ma, J., Cao, Z., Liao, X., Lu, H., 2020. Exposure to pyrimethanil induces developmental toxicity and cardiotoxicity in zebrafish. *Chemosphere* 255, 126889. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126889>
- Modarresi Chahardehi, A., Arsad, H., Lim, V., 2020. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants* 9, 1345. <https://doi.org/10.3390/plants9101345>
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P. de, Araújo, E. de L., Amorim, E.L.C. de, 2005. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova* 28, 892–896. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>
- Murugesu, S., Khatib, A., Ahmed, Q.U., Ibrahim, Z., Uzir, B.F., Benchoula, K., Yusoff,

- N.I.N., Perumal, V., Alajmi, M.F., Salamah, S., El-Seedi, H.R., 2019. Toxicity study on *Clinacanthus nutans* leaf hexane fraction using *Danio rerio* embryos. *Toxicol. Reports* 6, 1148–1154. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.020>
- Narko, T., Wibowo, M.S., Damayanti, S., Wibowo, I., 2020. Acute Toxicity Tests of Fermented Robusta Green Coffee Using Zebrafish Embryos (*Danio rerio*). *Pharmacogn. J.* 12, 485–492. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.75>
- Nusslein-Volhard C, D.R., 2002. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford Univ. Press.
- OECD, 2013, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- Osman, A.G.M., Mekkawy, I.A., Verreth, J., Kirschbaum, F., 2007. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Fish Physiol. Biochem.* 33, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9111-8>
- Patel, P., Panda, P.K., Kumari, P., Singh, P.K., Nandi, A., Mallick, M.A., Das, B., Suar, M., Verma, S.K., 2020. Selective in vivo molecular and cellular biocompatibility of black peppercorns by piperine-protein intrinsic atomic interaction with elicited oxidative stress and apoptosis in zebrafish *eleuthero* embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 192, 110321. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110321>
- Paul, J.H.A., Seaforth, C.E., Tikasingh, T., 2011. *Eryngium foetidum* L.: A review. *Fitoterapia* 82, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.010>
- Phillips, J.B., Westerfield, M., 2014. Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis. Model. Mech.* 7, 739–743. <https://doi.org/10.1242/dmm.015545>
- Prabha, S.; Athoibi, S.; DSouza, M.R., 2019. Pharmacognostical evaluation of Spiny coriander (*Eryngium foetidum* L.): A traditional culinary and ethnomedicinal herb. *Int. J. Bot. Stud.* 4, 64–70.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Promkum, C., Butryee, C., Tuntipopipat, S., Kupradinun, P., 2012. Anticlastogenic Effect of *Eryngium foetidum* L. Assessed by Erythrocyte Micronucleus Assay. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13, 3343–3347. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.7.3343>
- Rajan, M., Rajkumar, G., Farias Lima Guedes, T.J., Chagas Barros, R.G., Narain, N., 2020. Performance of different solvents on extraction of bioactive compounds, antioxidant and cytotoxic activities in *Phoenix loureiroi* Kunth leaves. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 17, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100247>

- Raunelli, P., Liviach, D., Alvis, R., Puente, S., Best, I., Reátegui, O., 2019. Cytoprotective Effect of the *Eryngium foetidum* “Sacha Culantro” Methanolic Leaf Extract Versus Sodium Fluoride Exposed Mice using the Micronucleus Test and the Comet Assay. *Pharmacogn. J.* 11, 461–465. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.72>
- Shavandi, M. A.; Haddadian, Z.; Ismail, M.H.S., 2012. *Eryngium foetidum* L. *Coriandrum sativum* and *Persicaria odorata* L.: a review. *J. Asian Sci. Res.* 2, 410–426.
- Simmons, S.O., Fan, C.-Y., Ramabhadran, R., 2009. Cellular Stress Response Pathway System as a Sentinel Ensemble in Toxicological Screening. *Toxicol. Sci.* 111, 202–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp140>
- Singh, S., Singh, D.R., Banu, S., Salim, K.M., 2013. Determination of Bioactives and Antioxidant Activity in *Eryngium foetidum* L.: A Traditional Culinary and Medicinal Herb. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 83, 453–460. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0141-y>
- Singh, S., Singh, D.R., Salim, K.M., Srivastava, A., Singh, L.B., Srivastava, R.C., 2011. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62, 765–773. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.585961>
- Song, Y., Zhu, L.S., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W., Xie, H., 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol. Biochem.* 41, 905–909. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.009>
- Sumitha, K.V., Prajitha, V., Sandhya, V.N., Anjana, S., Thoppil, J.E., 2014. Potential Larvicidal Principles in *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae), An Omnipresent Weed, Effective Against *Aedes albopictus* Skuse. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 17, 1279–1286. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.958544>
- Supraja, P.; Usha, R., 2013. Antibacterial and phytochemical screening from leaf and fruit extracts of *Momordica charantia*. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 4, pp.B-787-B-793.
- van den Brandhof, E.-J., Montforts, M., 2010. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1862–1866. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.031>
- Wang, W., Fang, S., Xiong, Z., 2019. Protective effect of polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong* hort against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in zebrafish embryo. *Carbohydr. Polym.* 221, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.087>
- Wang, X.H., Souders, C.L., Zhao, Y.H., Martyniuk, C.J., 2018. Paraquat affects mitochondrial bioenergetics, dopamine system expression, and locomotor activity in

- zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere* 191, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.032>
- Xia, Q., Luo, J., Mei, X., Wang, Y., Huang, W., Wang, J., Yang, R., Ma, Z., Lin, R., 2017. A developmental toxicity assay of *Carpesii Fructus* on zebrafish embryos/larvae. *Toxicol. Res. (Camb)*. 6, 460–467. <https://doi.org/10.1039/C7TX00005G>
- Xiong, G., Deng, Y., Cao, Z., Liao, X., Zhang, J., Lu, H., 2019a. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 95, 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.040>
- Xiong, G., Zou, L., Deng, Y., Meng, Y., Liao, X., Lu, H., 2019b. Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.002>
- Yu, M.A., Egawa, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Yeh, S.-R., Rousseau, D.L., Gerfen, G.J., 2011. Radical formation in cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1807, 1295–1304. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.06.012>
- Yuhlung, C. C.; Bhattacharyya, M., 2014. Practice of Ethno-medicine among the Chothe Tribe of Manipur, North-East India. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 5.
- Yumnamcha, T., Roy, D., Devi, M.D., Nongthomba, U., 2015. Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. *Toxicol. Environ. Chem.* 97, 1363–1381. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1093750>
- Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Su, J., Yu, C., 2011. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 26, 480–488. <https://doi.org/10.1002/tox.20575>

## Legendas das Figuras

**Figura 1.** Taxa de sobrevivência (%) avaliados diariamente de 24 até 120h de embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas as concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup> dos extratos de *Eryngium foetidum*. (A) aquoso (EA), (B) etanólico (EE) e (C) metanólico (EM).

**Figura 2.** Taxa de eclosão (%) de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) em 48, 72, 96 e 120hpf após exposição a diferentes concentrações (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>) dos extratos de *Eryngium foetidum*. (A) aquoso (EA), (B) etanólico (EE) e (C) metanólico (EM).

**Figura 3.** Embriões/ larvas de zebrafish nas 24, 48, 72 e 120hpf. No controle: desenvolvimento normal em 24, 48, 72 e 120hpf. EA 1,25 mg ml<sup>-1</sup>: retardo de crescimento em 24hpf e 48hpf; inibição da liberação de melanina às 48hpf com permanência às 72hpf.

**Figura 4.** Mudança na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST em embriões/larvas de zebrafish a 96hpf entre os grupos de controle e os tratados com os extratos de *Eryngium foetidum* em diferentes concentrações. (A, D, G) aquoso (EA), (B, E, H) etanólico (EE) e (C, F, I) metanólico (EM). As barras indicam a média ± SEM de três repetições (n = 3). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) entre os grupos.

**Figura 5.** Efeitos dos extratos de *Eryngium foetidum* na apoptose de larvas de zebrafish. (A) aquoso (EA), (B) etanólico (EE) e (C) metanólico (EM). Os níveis de apoptose foram medidos após coloração com laranja de acridina por análise de imagem e microscópio de fluorescência. Dados obtidos de análises individuais de intensidade de fluorescência de larvas de zebrafish. Os valores são expressos como média ± SEM. (D) Coloração AO (4X) de larvas de zebrafish a 96 hpf no controle e tratados com EA.

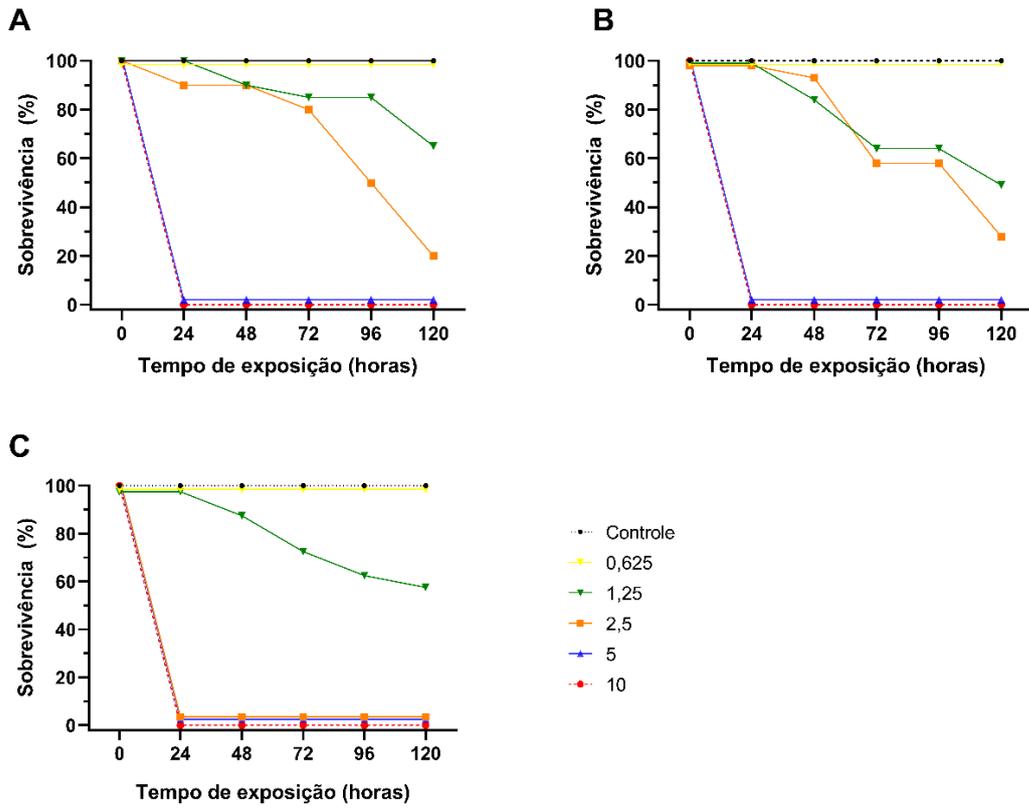


Figura 1.

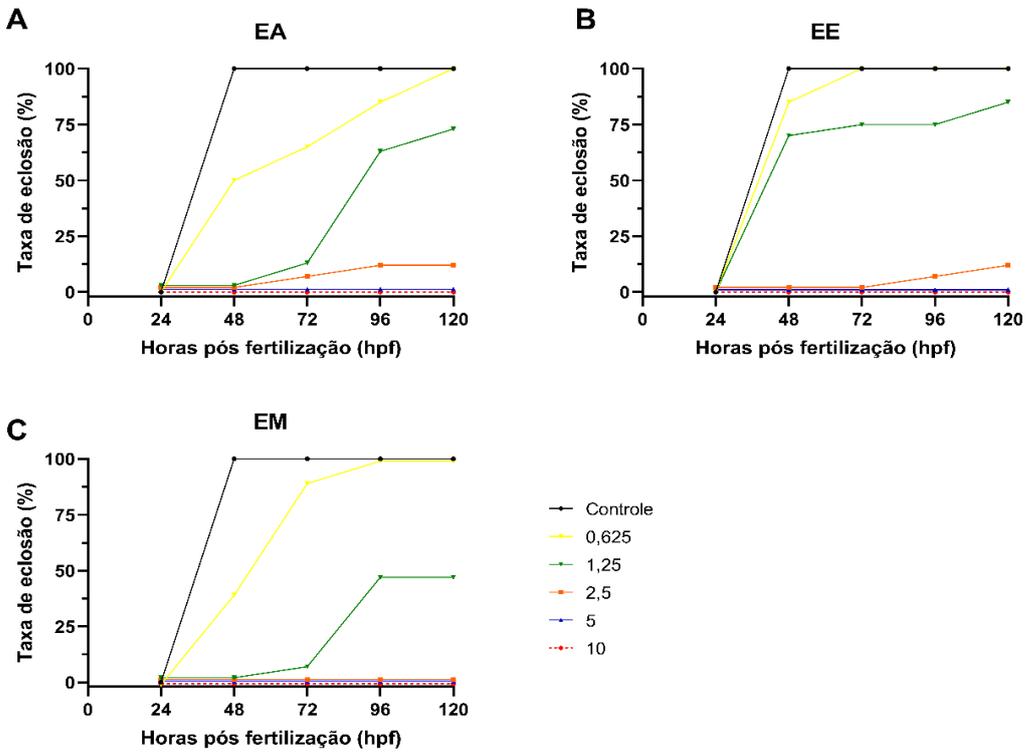
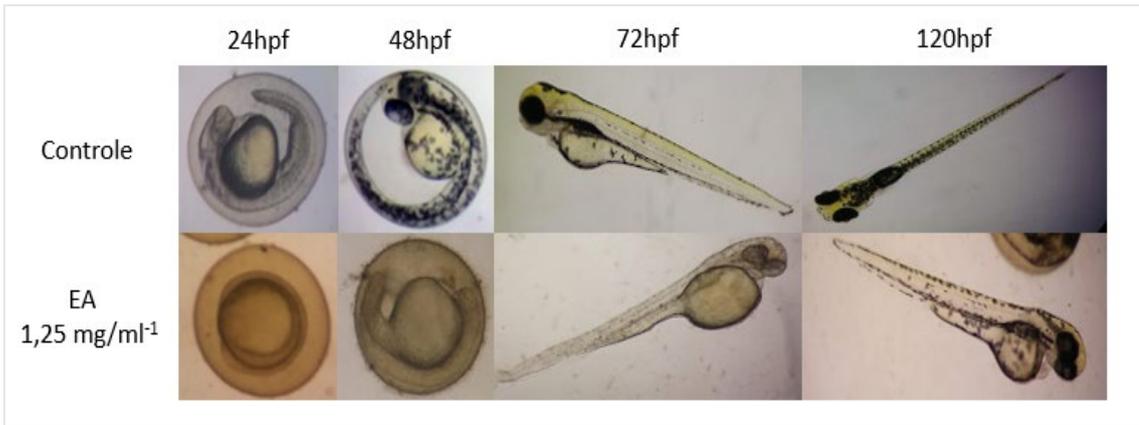
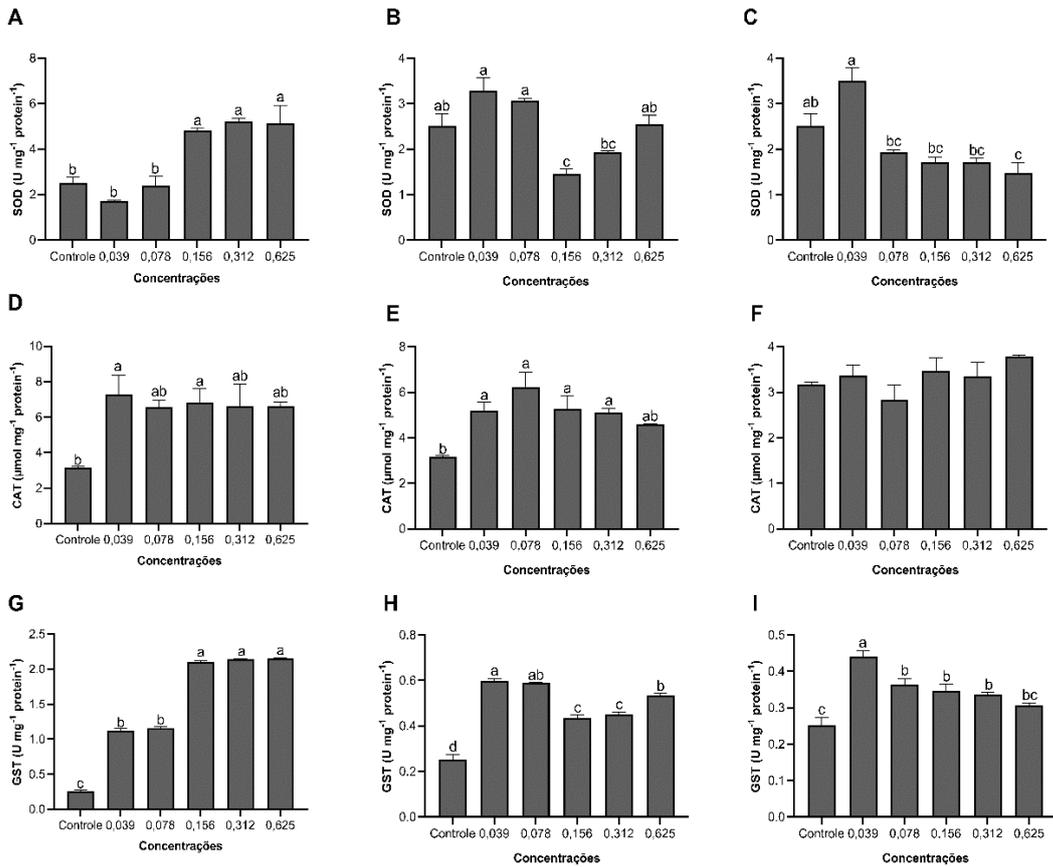


Figura 2.



**Figura 3.**



**Figura 4.**

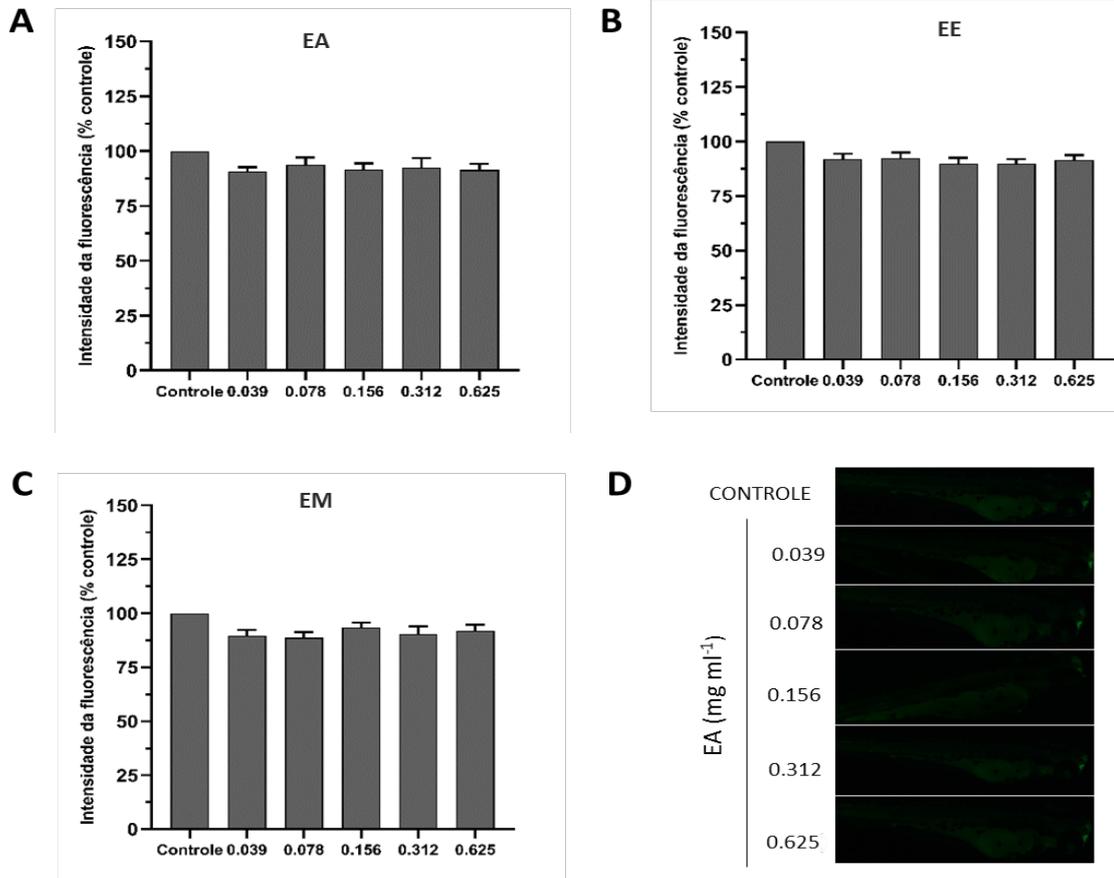


Figura 5.

**ARTIGO 3- EFEITO PROTETOR CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE *Eryngium foetidum* EM  
EMBRIÕES E LARVAS ZEBRAFISH**

Artigo segue as normas do periódico Journal of Ethnopharmacology, ao qual será submetido.

\*Este artigo é um versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

**Efeito protetor contra o estresse oxidativo e atividade anti-inflamatória de extratos de *Eryngium foetidum* em embriões e larvas zebrafish**

Tassia Flavia Dias Castro<sup>a</sup>, William Franco Carneiro<sup>a</sup>, Tharyn Reichel<sup>b</sup>, Kiara Cândido Duarte da Silva<sup>a</sup>, Maria de Fátima Santos<sup>b</sup>, Mônica Rodrigues Ferreira Machado<sup>c</sup>, Luciane Vilela Resende<sup>b</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Jataí, Goiás, Brasil.

\*Autor correspondente: Luis David Solis Murgas

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Campus Universitário, Caixa postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil E-mail: [lsmurgas@dmv.ufla.br](mailto:lsmurgas@dmv.ufla.br)

Telefone: +553538291728

## RESUMO

**Relevância etnofarmacológica:** O estresse oxidativo e a inflamação estão comumente presentes em muitas doenças crônicas humanas e de outros animais. Essas respostas estão intimamente relacionadas aos processos fisiopatológicos. O processo inflamatório pode induzir estresse oxidativo e vice-versa por meio da ativação de múltiplas vias. Além disso, são relatados no uso clínico efeitos colaterais adversos decorrentes dos anti-inflamatórios comumente utilizados, o que torna ainda mais necessária a busca por novos medicamentos. Portanto, agentes com atividade antioxidante e /ou anti-inflamatória são muito úteis no tratamento de diversas patologias.

**Objetivo do estudo:** Investigar os efeitos protetores dos extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e metanólico (EM) de *Eryngium foetidum* contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em embriões/larvas de zebrafish, e suas atividades anti-inflamatórias.

**Material e métodos:** Embriões de zebrafish a 3-4hpf (horas por fertilização) foram pré-incubados com os extratos de *E. foetidum* (0; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>) por 1h, sendo, em seguida, adicionados 7,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio e os embriões foram incubados até 96hpf. Para determinar o efeito protetor dos extratos contra o estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a atividade as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) foram medidas e a apoptose celular pela coloração laranja de acridina. A

atividade anti-inflamatório foi analisada através do número de neutrófilos migrados para local da ferida na nadadeira caudal nas larvas de zebrafish.

**Resultados:** As enzimas antioxidantes SOD e CAT apresentaram atividade elevada em larvas de zebrafish expostas à  $H_2O_2$  (7,5mM). Entretanto, reduções significativas ocorreram na atividade destas enzimas, quando as larvas foram expostas a diferentes concentrações de EE e EM (0,156; 0,312 e 0,625  $mg\ mL^{-1}$ ) e EA (0,039, 0,078 e 0,156  $mg\ mL^{-1}$ ). Para a enzima GST, foi verificada aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em sua atividade em todas as larvas expostas a EA e EM e uma reduzida atividade para extrato EE em relação ao grupo submetido ao  $H_2O_2$ . A apoptose induzida por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi significativamente reduzida pelos extratos (EA, EE e EM) de maneira dependente da concentração. Uma redução efetiva da apoptose causada por  $H_2O_2$  foi observada após o tratamento com extrato (0,156; 0,312 e 0,625  $mg\ mL^{-1}$  EA, 0,625  $mg\ mL^{-1}$  EE; 0,156 e 0,312  $mg\ mL^{-1}$  EM), levando a apoptose ao mesmo nível do grupo controle (sem peróxido). Em relação a atividade anti-inflamatória, uma redução significativa no número de neutrófilos migrados para a região lesionada da cauda foi verificada em larvas de zebrafish tratadas com o extrato etanólico.

**Conclusão:** Coletivamente, os resultados deste estudo auxiliam na determinação dos efeitos dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Eryngium foetidum* na inibição do estresse oxidativo, apoptose celular e suprimiram o recrutamento de neutrófilos. Os resultados indicam que as atividades farmacológicas de *E. foetidum* são influenciadas pela natureza do solvente utilizado para extração e das concentrações utilizadas. Entre os extratos testados, o extrato aquoso foi capaz de atenuar o dano induzido por  $H_2O_2$ , enquanto que, o extrato etanólico desempenhou um papel fundamental nos benefícios anti-inflamatórios de *E. foetidum*. Acreditamos que essas descobertas fornecem evidências para as aplicações da *E. foetidum* no desenvolvimento de produtos alimentícios nutritivos e aditivos ou medicamentos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias melhoradas.

Palavras-chaves: apoptose, atividade antioxidante, inflamação, neutrófilos, *Danio rerio*.

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo surge devido a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua eliminação pela atividade dos antioxidantes. Sua eliminação é necessária, pois, devido à naturezas altamente reativas, as ROS podem causar danos em constituintes importantes das células, como danos às proteínas, aos lipídios das membranas celulares, e ao DNA (LACKMANN et al., 2018). Além disso, o estresse oxidativo pode induzir uma variedade de citocinas, as quais podem aumentar a inflamação e induzir apoptose e necrose celular (KÖKTÜRK et al., 2020).

A inflamação é um processo biológico altamente regulado, que permite, ao sistema imunológico, remover com eficiência os estímulos prejudiciais e iniciar o processo de reparação tecidual (FREIRE & VAN DYKE, 2013; YANG et al., 2018). Embora a inflamação seja um mecanismo de defesa, consiste de um complexo evento no qual os mediadores envolvidos na inflamação prolongada podem induzir várias doenças e distúrbios.

O estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente ligados (BISWAS, 2016). Se a inflamação é o evento primário, os macrófagos e neutrófilos ativados liberam grandes quantidades de espécies reativas no local da inflamação (FIALKOW et al., 2007). Conseqüentemente, o estresse oxidativo se desenvolverá e aumentará ainda mais a inflamação. Por outro lado, se o estresse oxidativo aparecer, as espécies reativas de oxigênio / nitrogênio superproduzidas podem induzir a inflamação por meio da regulação positiva da expressão do gene pró-inflamatório (BISWAS, 2016). Portanto, encontrar agentes que inibem a produção de ROS e mediadores inflamatórios tem sido considerado uma estratégia promissora para prevenir ou tratar doenças associadas a condições inflamatórias crônicas (NGUYEN et al., 2020). Além disso, são relatados no uso clínico, efeitos colaterais adversos decorrentes dos anti-inflamatórios comumente utilizados (MATHEW et al., 2007), o que torna ainda mais necessária a busca por novos medicamentos.

*Eryngium foetidum* é uma planta pertencente à família Apiaceae, cosmopolita, podendo ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais (CARDOZO et al., 2004). É utilizada como especiaria culinária ou na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças (BUSSMANN et al., 2018; LANS, 2007; LEISHANGTHEM & SHARMA, 2014; LEITÃO et al., 2020; MALIK et al., 2016; PAUL et al., 2011; SHAVANDI et al., 2012; YUHLUNG & BHATTACHARYYA, 2014). Vários estudos indicaram a presença de glicosídeos, flavonoides, terpenóides, esteróides, taninos, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico, saponina, triterpenóides, assim como aldeídos e sesquiterpenos nos extratos dessa

planta (LINGARAJU et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020; SINGH et al., 2013; THOMAS et al., 2017). Dentre esses compostos, os fenólicos e os flavonoides exibiram atividade antioxidante e potencial atividade anti-inflamatória em modelos experimentais (MEKHORA et al., 2012; PRABHA et al., 2019; PROMTEs et al., 2016; RAUNELLI et al., 2019). Apesar dos seus benefícios, os conhecimentos sobre esta espécie devem ser aprofundados e mais estudos realizados, para que, os dados sobre essas plantas sejam validados com segurança.

O zebrafish (*Danio rerio*) foi usado como modelo alternativo *in vivo* para estudar o desenvolvimento de condições humanas, como estresse oxidativo e inflamação e na descoberta de medicamentos (KANG et al., 2015; KIM et al., 2014; PHILLIPS & WESTERFIELD, 2014; POLEDNIK et al., 2018; UDAYA et al., 2020; WANG et al., 2019; YANG et al., 2018). Várias características tornam o zebrafish uma ferramenta convincente na descoberta de medicamentos, como baixo custo de manutenção, embriogênese rápida, transparência, alta similaridade com o genoma humano (HOWE et al., 2013; MEYERS, 2018; PADILLA & GLABERMAN, 2020). As respostas oxidativas e inflamatórias podem ser facilmente induzidas e visualizadas no zebrafish, particularmente nos estágios iniciais (PEREIRA et al., 2016). Portanto, embriões e larvas de zebrafish são agora amplamente aceitos para a análise *in vivo* de moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias (ZAMPIERI et al., 2020).

Neste estudo, investigamos os efeitos protetores de diferentes extratos de *Eryngium foetidum* contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em embriões/larvas de zebrafish, bem como suas atividades anti-inflamatórias.

## **2 MATERIAL E METÓDOS**

### **2.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA**

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o número de protocolo 014/2019 e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório.

## 2.2 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O material vegetal utilizado foi coletado no setor de olericultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras- UFLA. Os extratos vegetais (10% p/v) foram preparados empregando-se um sistema de refluxo. Os materiais vegetais frescos (partes aéreas das plantas, incluindo flores, folhas e caules) foram cortados em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> e destilados em solução de água destilada, etanol 70% e metanol 50% por 20 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados a vácuo e rotaevaporados a 40°C, até secagem, sendo armazenados a -20 °C até posterior utilização.

## 2.3 CRIAÇÃO DE PEIXES E COLETA DE EMBRIÕES

Machos e fêmeas de zebrafish adultos foram adquiridos no Biotério Central- UFLA, sendo criados e mantidos em racks específicas para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40), mantidos à temperatura de 28±1°C, sob um ciclo claro/escuro de 14/10h. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial floculada (Alcon basic, Alcon Pet®, SC, BRA) e uma vez com nauplios de artêmia. Os embriões foram obtidos a partir da desova natural estimulada pela manhã ao acender a luz. A coleta de embriões foi concluída após 30 min, sendo lavados em meio de cultura de embriões (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,33 mM e MgSO<sub>4</sub> 0,33 mM e azul de metileno) e mantidos em estufa a 28±1°C.

## 2.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS EXTRATOS DE *E. foetidum* NA TOXICIDADE INDUZIDA POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A atividade antioxidante dos extratos vegetais, foi avaliada baseada no seu efeito protetor contra a toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (KANG et al., 2015). Primeiramente, embriões de 3-4hpf (horas pós fertilização) foram tratados com um gradiente de concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5-15 mM), sendo selecionada a concentração de 7,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como a concentração letal média, para utilização nos ensaios.

Embriões de zebrafish (grupo= 60 embriões) a 3-4hpf foram pré-incubados com os extratos aquoso, etanólico e metanólico de *E. foetidum* (0; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>) por 1h a 28±1°C. Após esse período, 7,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado ao meio com os extratos e os embriões permaneceram neste meio até atingirem o estágio de 96hpf. As

larvas então, foram coletadas e utilizadas para a determinação do estresse oxidativo e apoptose celular.

#### **2.4.1 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Para a realização dos ensaios bioquímicos, 40 larvas/grupo, foram homogeneizadas em 400 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) fria e depois centrifugadas 4000 xg a 4 ° C por 20 minutos (XIONG et al., 2019a, 2019b). Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação da atividade enzimática de SOD, CAT e GST, de acordo com as metodologias descritas por Song et al. (2009), Clairborne (1985) e Habig e Jakoby (1981).

#### **2.4.2 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS**

A apoptose celular do zebrafish foi avaliada conforme descrito por Manjunatha et al.(2021). Resumidamente, após exposição das larvas (item 2.4), estas foram incubadas com solução de laranja de acridina (AO) (5 mg L<sup>-1</sup>) durante 20 min, sendo posteriormente observadas e fotografadas em um microscópio de fluorescência (Axio Observer Z1, Zeiss, Jena, DE) e a intensidade da fluorescência das imagens foi quantificada usando o software ImageJ (National Institutes of Health, NIH) (MANJUNATHA et al., 2021; WANG et al., 2019). Os resultados foram expressos como a mudança de fluorescência no meio do grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo esse considerado 100%.

#### **2.5 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DA CAUDA EM ZEBRAFISH**

Larvas utilizadas para o corte da nadadeira caudal foram cultivadas em meio de cultura de embriões contendo 0,003% de 1-fenil-2-tioureia (PTU; Sigma -Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) adicionado às 8hpf para bloquear a melanização das larvas. Antes da lesão, as larvas de 72hpf foram pré tratadas por 2h com diferentes concentrações dos extratos (0,039; 0,078; 0,156 e 0,312 mg mL<sup>-1</sup>), sendo utilizadas 15 larvas por tratamento. Para este ensaio, a concentração de 0,625 mg mL<sup>-1</sup> não foi utilizada por ter apresentado toxicidade (atraso no desenvolvimento) em estudos prévios não publicados.

Após o período de 2 h, as larvas foram anestesiadas com 0,16 mg mL<sup>-1</sup> de tricaina (Sigma Aldrich), colocadas sobre uma placa de petri e as caudas foram cortadas com uma lâmina de bisturi cirurgica em locais logo após a notocorda com auxílio de um

estereomicroscópio (Stemi 2000-C, Zeiss) (HASEGAWA et al., 2017; KAWAKAMI et al., 2004) (Fig 3A). Em seguida, as larvas foram retornadas às soluções de pré-lesão (extratos) e incubadas a 28°C por 6 horas, sendo posteriormente fixadas em paraformaldeído a 4% (overnight) e coradas com solução Sudan Black-SB (Sigma Aldrich), durante 20 min (LE GUYADER et al., 2008; POLEDNIK et al., 2018). As células positivas para SB foram observadas em estereomicroscópio, quantificadas na área da lesão.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados de antioxidante, apoptose e inflamação foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, em seguida, os dados foram submetidos a Two-Way ANOVA, e teste de Tukey para verificar as diferenças significativas entre os tratamentos. Todos os dados foram analisados com nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ), utilizando o software estatístico Minitab v.19 (State College, PA, USA).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a atividade antioxidante dos extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e metanólico (EM) de *E. foetidum* foi avaliada baseada nos seus efeitos protetores contra a toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo posteriormente medidas as atividades das enzimas SOD, CAT e GST e apoptose celular.

### 3.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Conforme demonstrado na figura 1, larvas de zebrafish expostas à  $H_2O_2$  (7,5mM), apresentaram atividades elevadas das enzimas SOD e CAT. Entretanto, reduções significativas ( $p < 0,05$ ) ocorreram na atividade destas enzimas, quando as larvas foram expostas aos extratos. Para EE e EM reduções nas atividades da SOD e CAT foram observadas nas maiores concentrações testadas (0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>), ao passo que, para as concentrações de 0,039 e 0,078 mg mL<sup>-1</sup>, as atividades dessas enzimas foram semelhantes ao grupo apenas com  $H_2O_2$ .

As enzimas superóxido dismutase (SOD) convertem ânions de superóxido de radical livre ( $O_2^{\cdot -}$ ) em moléculas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) as quais são degradadas em água e oxigênio, pela enzima catalase (CAT), livrando assim, as células do risco de oxidação por

esses radicais (JI et al., 2020). Um aumento nos níveis da SOD e CAT indica uma resposta do organismo contra o estresse oxidativo (SAUCEDO-VENCE et al., 2015). Dessa forma, no presente estudo, o aumento da SOD e CAT podem refletir um esforço do organismo para eliminar os radicais livres gerados pela exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, atividades diminuídas podem indicar uma capacidade antioxidante dos extratos *E. foetidum* dependentes da concentração. Estudos comprovam que os extratos foliares dessa espécie apresentam atividades antioxidantes, sendo responsáveis por estas atividades, os compostos flavonoides, fenólicos e taninos, os quais podem atuar na eliminação dos radicais livres de uma forma direta (PRABHA et al., 2019; RAUNELLI et al., 2019; SINGH et al., 2011).

Para o extrato aquoso (EA), a atividade da SOD apresentou-se de maneira contrária de EE e EM, onde as maiores concentrações (0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>) apresentaram elevada atividade da SOD. Estudos realizados por Singh et al. (2013) relatam uma menor presença de taninos e flavonoides em extratos aquosos de *E. foetidum* quando comparados a solventes etanólicos e metanólicos. Assim, mesmo nas maiores concentrações, o EA por possuir menos taninos e flavonoides, apresenta menor atividade antioxidante, e o organismo tenta controlar o estresse oxidativo aumentando a atividade da SOD. Acreditamos que, a redução da SOD nas menores concentrações (0,039, 0,078 e 0,156 mg mL<sup>-1</sup>) de EA deve-se à modificações ocorridas em seus sítios ativos pelo excesso de peróxido de hidrogênio, levando à perda de atividade e funções (BUTTERFIELD et al., 1998; NI et al., 2019).

As GSTs são enzimas de biotransformação de fase II, que desempenham um papel fisiológico específico na desintoxicação no zebrafish (GLISIC et al., 2015). Estão envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e na eliminação de espécies reativas de oxigênio e produtos da lipoperoxidação (CHATTERJEE & GUPTA, 2018; ZHU et al., 2011). Para a enzima GST, foi verificado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em sua atividade em todas as larvas expostas a EA e EM e uma reduzida atividade para EE, em comparação com grupo exposto apenas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse diferente comportamento da enzima GST para os extratos pode estar relacionado a concentração de flavonoides nesses extratos. Investigações fitoquímicas anteriores abordam que os extratos etanólicos de *E. foetidum* possuem maior conteúdo de flavonoides, em relação a extratos metanólico e aquoso (MALIK et al., 2016; MEKHORA et al., 2012).

Sabe-se que os flavonoides possuem propriedades antioxidantes ao promover a remoção excessiva de radicais livres, agindo como um agente neutralizante (JIA et al., 2017). Estas substâncias também são capazes de induzir a atividade de enzimas desintoxicantes de fase II como a glutatona S-transferase (LEE-HILZ et al., 2006; PROCHÁZKOVÁ et al.,

2011). Além disso, os flavonoides são xenobióticos típicos para animais e humanos, metabolizados como tal e rapidamente removidos da circulação (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011). Dessa forma, o aumento na atividade da GST nos embriões/larvas expostos a EA e EM de *E. foetidum*, pode ser devido ao estímulo dos flavonoides dos extratos mesmo que em concentrações baixas para eliminar compostos tóxicos ou pela sua própria eliminação como xenobiótico. Os flavonoides também, dependendo de suas concentrações, podem apresentar propriedades pró-oxidantes, promovendo a oxidação de outros compostos (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011). Segundo Bagnyukova et al. (2006) e Ni et al. (2019), a redução da atividade da enzima GST, pode estar relacionada com a presença de oxidantes que poderiam levar a inativação da atividade enzimática. Como os extratos etanólicos de *E. foetidum* possuem maior conteúdo de flavonoides, que EM e EA, a diminuição da atividade de GST em larvas expostas a EE em comparação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi possivelmente resultante da presença de oxidantes do meio, promovidos pela propriedade pró-oxidante dos flavonoides.

### 3.2 APOPTOSE CELULAR

A apoptose celular induzida por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) pelos extratos (EA, EE e EM) de maneira dependente da concentração (Fig 2). Reduções efetivas na apoptose causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram encontradas após o tratamento com os extratos (0,156; 0,312 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup> EA, 0,625 mg mL<sup>-1</sup> EE; 0,156 e 0,312 mg mL<sup>-1</sup> EM), apresentando as larvas desses tratamentos, uma apoptose semelhante ao grupo controle (sem peróxido). A presença de apoptose nos embriões controle, demonstra que a morte celular programada é um processo fisiológico normal durante o desenvolvimento. Coletivamente, esses resultados demonstraram que *E. foetidum* exerceu um efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no modelo zebrafish.

Dentre os extratos testados, o EA foi o que melhor apresentou proteção das larvas contra a apoptose. Essa proteção pode ser atribuída a uma maior presença de polifenóis nesse extrato. Relatos na literatura indicam que uma maior recuperação de polifenóis é obtida quando utilizado solvente aquoso (SINGH et al., 2013), possuindo esses bioativos um efeito anti apoptótico (KAMPA et al., 2007). Esse efeito pode ser atribuído não apenas à capacidade de agir como antioxidante, eliminando os radicais livres, mas também à capacidade de interagir com mecanismos celulares básicos (KAMPA et al., 2007). Da mesma forma, como no presente estudo, uma inibição da apoptose por polifenóis também foi relatada em células humanas de eritroleucemia ao inibir a atividade da lipoxigenase e da

ciclooxigenase e um efeito neuroprotetor ao inibir a apoptose induzida por 6-hidroxi dopamina em células PC12 (MACCARRONE et al., 1999; NIE et al., 2002).

Além do EA, o EM também apresentou uma significativa inibição da apoptose. O efeito protetor do extrato metanólico de *E. foetidum* também foi observado em outro estudo, ao reduzir efeitos oxidantes do fluoreto de sódio em camundongos (RAUNELLI et al., 2019). Isso, pode ser devido à presença de ácido ascórbico, que é um forte eliminador de radicais livres, nas folhas de *E. foetidum*, o qual é melhor obtido quando utilizado o metanol como meio extrator. (SINGH et al., 2013).

Os nossos resultados fornecem fortes evidências para o potencial protetor e/ou anti-apoptótico da planta e sua possível utilização como antioxidante natural, tendo os polifenóis e ácido ascórbico, os principais fatores contribuinte para essas propriedades.

### **3.3 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DA CAUDA EM ZEBRAFISH**

Os resultados obtidos para o grupo controle mostraram uma média de 8-9 neutrófilos infiltrados na área lesionada da cauda das larvas de zebrafish, sem diferenças significativas para aquelas larvas tratadas com o extrato aquoso e metanólico. Ao contrário, em larvas expostas as concentrações de 0,156; 0,078 e 0,039 mg mL<sup>-1</sup> extrato etanólico, o número de neutrófilos na lesão foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ).

Os neutrófilos, representam umas das primeiras linhas de defesa dos organismos e seu recrutamento para os tecidos periféricos é indispensável, atuando como fagócitos, tanto de patógenos quanto de restos celulares (GEERING et al., 2013; MAYADAS et al., 2014; ROSALES, 2018). Apesar da sua migração para locais de inflamação serem essenciais para as respostas fisiológicas a lesões e infecções de tecidos, a atividade descontrolada ou recrutamento excessivo dos neutrófilos podem levar a inflamações persistentes, dano tecidual e ocasionar doenças (GERNEZ et al., 2010). Isso porque, quando ativados, os neutrófilos induzem a produção além das citocinas pró-inflamatórias, mediadores inflamatórios, como prostaglandina E2 e o óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteases (elastase neutrofílica, metaloproteinases e catepsina G), os quais promovem lesão tecidual (MILLS & O'NEILL, 2016; TRIPATHI et al., 2007). Dessa forma, para resolver a inflamação, os neutrófilos devem ser eliminados de maneira eficiente e controlada, seja por apoptose e envolvimento de macrófagos, seja pela saída do local da inflamação por meio da migração reversa (FARRERA & FADEEL, 2013; HENRY et al., 2013). Portanto, estratégias

de descobertas de drogas podem ser desenvolvidas para o tratamento da inflamação (YANG et al., 2018).

*Eryngium foetidum* é usado na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças inflamatórias (SILALAH, 2021). Entretanto, observamos pela primeira vez os efeitos de diferentes extratos de *E. foetidum* na migração de neutrófilos após a lesão na cauda de zebrafish. Os resultados mostraram uma redução significativa no número de neutrófilos recrutados 6 horas após a injúria (hpi) apenas para os embriões expostos ao extrato etanólico. Essa atividade anti-inflamatória do extrato etanólico *Eryngium foetidum* também foi relatada por Mekhora et al. (2012), em macrófagos de camundongos ativados por LPS. Segundo esses autores, o pré tratamento com extrato etanólico de *E. foetidum* inibiu efetivamente a expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios induzido por LPS, sendo esse potencial associado à maior concentração de flavonoides em extratos etanólicos (MALIK et al., 2016; MEKHORA et al., 2012).

Os flavonoides têm a capacidade de interferir nos processos inflamatórios, por atuarem sobre as funções das células que medeiam a inflamação (RIBEIRO et al., 2015). Por exemplo, acredita-se que, em geral, os flavonóides atuam como reguladores negativos da célula mielóide (principalmente macrófagos), promovendo a inibição de vasodilatadores pró-inflamatório (óxido nítrico sintase induzida- iNOS), bem como a inibição da ciclooxigenase (COX) -2, citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 e outros marcadores (GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2011). O extrato etanólico *E. foetidum* é rico em flavonoides como quercetina, luteolina, apigenina, e kaempferol o quais foram descritos como inibidores da liberação de  $\beta$ -glucuronidase e lisozima de neutrófilos ativados (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009). Da mesma forma, durante a lesão celular ocorre uma grande liberação de EROS, que podem ser também inibidas por flavonoides (AGATI et al., 2012).

Assim como no presente trabalho, relatos anteriores com outros modelos animais também demonstram a atividade anti-inflamatória de *E. foetidum*. Um extrato hexano das folhas de *E. foetidum* enriquecido com estigmasterol também foi relatado para exibir atividade anti-inflamatória tópica contra inflamação aguda e crônica induzida pela aplicação tópica de acetato de 12- *O*- tetradecanoilforbol (TPA) na orelha de um camundongo (GARCÍA et al., 1999). A ingestão de uma decocção de folhas de *E. foetidum* também mostrou inibição de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por TPA em roedores (SAENZ et al., 1997). Embora, tenham sido relatadas em estudos anteriormente as atividades anti-inflamatória das folhas de *E. foetidum*, o presente trabalho, demonstra, pela primeira vez, a atividade anti-inflamatória dessa espécie em zebrafish.

## CONCLUSÃO

Coletivamente, os resultados deste estudo auxiliam na determinação dos efeitos dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Eryngium foetidum* na inibição do estresse oxidativo, apoptose celular e na supressão do recrutamento de neutrófilos. Os resultados indicam que as atividades farmacológicas *E. foetidum* são influenciadas pela natureza do solvente utilizado para extração e pelas concentrações utilizadas. Entre os extratos testados, o extrato aquoso foi capaz de atenuar o dano induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que, o extrato etanólico desempenhou um papel fundamental nos benefícios anti-inflamatórios de *E. foetidum*.

Acreditamos que essas descobertas fornecem evidências de apoio para as aplicações da *E. foetidum* no desenvolvimento de produtos alimentícios nutritivos e aditivos ou medicamentos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias melhoradas.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Rede Mineira de Bioterismo, da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Aswathy, P. M., & Saj, O.P., 2014. Carminative, phytochemical and antioxidant potentialities of the leaf extracts of *Eryngium foetidum* L.(Apiaceae). *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 3,

2269–2280.

- Bagnyukova, T., Chahrak, O., Lushchak, V., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>
- Biswas, S.K., 2016. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
- Bussmann, R.W., Paniagua Zambrana, N.Y., Romero, C., Hart, R.E., 2018. Astonishing diversity—the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 14, 43. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0241-8>
- Butterfield, D.A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M., Carney, J., 1998. Structural and Functional Changes in Proteins Induced by Free Radical-mediated Oxidative Stress and Protective Action of the Antioxidants N-tert-Butyl-alpha-phenylnitron and Vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854, 448–462. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09924.x>
- Cardozo, E., Rubio, M., Rojas, L.B., Usabillaga, A., 2004. Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *J. Essent. Oil Res.* 16, 33–34. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698645>
- Chatterjee, A., Gupta, S., 2018. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* 433, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028>
- Clairborne, A., 1985. Catalase activity. Greenwald, R.A., Ed., *CRC Handb. Methods Oxyg. Radic. Res.* CRC Press.
- Farrera, C., Fadeel, B., 2013. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J. Immunol.* 191, 2647–2656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300436>
- Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030>
- Freire, M.O., Van Dyke, T.E., 2013. Natural resolution of inflammation. *Periodontol.* 2000 63, 149–164. <https://doi.org/10.1111/prd.12034>
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 58, 537–552. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0037-3>
- García, M.D., Sáenz, M.T., Gómez, M.A., Fernández, M.A., 1999. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute

- inflammation models. *Phyther. Res.* 13, 78–80. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199902\)13:1<78::AID-PTR384>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1<78::AID-PTR384>3.0.CO;2-F)
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., Simon, H.-U., 2013. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* 34, 398–409. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.002>
- Gernez, Y., Tirouvanziam, R., Chanez, P., 2010. Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? *Eur. Respir. J.* 35, 467–469. <https://doi.org/10.1183/09031936.00186109>
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 158, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
- González-Gallego, J., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., 2014. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties of Dietary Flavonoids, in: *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier, pp. 435–452. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00032-3>
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Medina, F.S. De, 2011. Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 331–362. <https://doi.org/10.1080/10408390903584094>
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. pp. 398–405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
- Hasegawa, T., Hall, C.J., Crosier, P.S., Abe, G., Kawakami, K., Kudo, A., Kawakami, A., 2017. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 $\beta$  is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.22716>
- Henry, K.M., Loynes, C.A., Whyte, M.K.B., Renshaw, S.A., 2013. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* 94, 633–642. <https://doi.org/10.1189/jlb.1112594>
- Howe, K. et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., Li, M., 2020. Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species—A Review. *Molecules* 25, 917. <https://doi.org/10.3390/molecules25040917>
- Jia, S., Shen, M., Zhang, F., Xie, J., 2017. Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2555.

<https://doi.org/10.3390/ijms18122555>

- Kampa, M., Nifli, A.-P., Notas, G., Castanas, E., 2007. Polyphenols and cancer cell growth, in: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 79–113. [https://doi.org/10.1007/112\\_2006\\_0702](https://doi.org/10.1007/112_2006_0702)
- Kang, M.-C., Kim, S.-Y., Kim, E.-A., Lee, J.-H., Kim, Y.-S., Yu, S.-K., Chae, J.B., Choe, I.-H., Cho, J.H., Jeon, Y.-J., 2015. Antioxidant activity of polysaccharide purified from *Acanthopanax koreanum* Nakai stems in vitro and in vivo zebrafish model. *Carbohydr. Polym.* 127, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.043>
- Kawakami, A., Fukazawa, T., Takeda, H., 2004. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Dev. Dyn.* 231, 693–699. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20181>
- Kim, S.-Y., Kim, E.-A., Kang, M.-C., Lee, J.-H., Yang, H.-W., Lee, J.-S., Lim, T. Il, Jeon, Y.-J., 2014. Polyphenol-rich fraction from *Ecklonia cava* (a brown alga) processing by-product reduces LPS-induced inflammation in vitro and in vivo in a zebrafish model. *ALGAE* 29, 165–174. <https://doi.org/10.4490/algae.2014.29.2.165>
- Köktürk, M., Alak, G., Atamanalp, M., 2020. The effects of n-butanol on oxidative stress and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 227, 108636. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108636>
- Lackmann, C., Santos, M.M., Rainieri, S., Barranco, A., Hollert, H., Spirhanzlova, P., Velki, M., Seiler, T.-B., 2018. Novel procedures for whole organism detection and quantification of fluorescence as a measurement for oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere* 197, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.045>
- Lans, C., 2007. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3, 13. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-13>
- Le Guyader, D., Redd, M.J., Colucci-Guyon, E., Murayama, E., Kissa, K., Briolat, V., Mordelet, E., Zapata, A., Shinomiya, H., Herbomel, P., 2008. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood* 111, 132–141. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095398>
- Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.-M.J.F., Westphal, A.H., van Berkel, W.J.H., Aarts, J.M.M.J.G., Rietjens, I.M.C.M., 2006. Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1499–1505. <https://doi.org/10.1021/tx060157q>
- Leishangthem, S.; Sharma, L.D., 2014. Study of Some important Medicinal Plants found in

- Imphal-East District, Manipur India. . Int. J. Sci. Res. Publ. 4, 1–5.
- Leitão, D. do S.T.C., Siqueira, F.C., de Sousa, S.H.B., Mercadante, A.Z., Chisté, R.C., Lopes, A.S., 2020. Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity. Int. J. Food Prop. 23, 1452–1464. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1811311>
- Li, S., Jiang, Y., Sun, Q., Coffin, S., Chen, L., Qiao, K., Gui, W., Zhu, G., 2020. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 241, 125129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125129>
- Lingaraju, D. P., Sudarshana, M. S., Mahendra, C., & Rao, K.P., 2016. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf extracts of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). Indo Am. J. Pharm. Res. 6, 4339–4344.
- Maccarrone, M., Lorenzon, T., Guerrieri, P., Agro, A.F., 1999. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. Eur. J. Biochem. 265, 27–34. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00630.x>
- Malik, T., Pandey, D.K., Roy, P., Okram, A., 2016. Evaluation of Phytochemicals, Antioxidant, Antibacterial and Antidiabetic Potential of *Alpinia galanga* and *Eryngium foetidum* Plants of Manipur (India). Pharmacogn. J. 8, 459–464. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.5.8>
- Manjunatha, B., Deekshitha, B., Seo, E., Kim, J., Lee, S.J., 2021. Developmental toxicity induced by particulate matter (PM2.5) in zebrafish (*Danio rerio*) model. Aquat. Toxicol. 238, 105928. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105928>
- Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C. V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., Tanguay, R.L., 2007. Unraveling Tissue Regeneration Pathways Using Chemical Genetics. J. Biol. Chem. 282, 35202–35210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706640200>
- Mayadas, T.N., Cullere, X., Lowell, C.A., 2014. The Multifaceted Functions of Neutrophils. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 9, 181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- Mekhora, C., Muangnoi, C., Chingsuwanrote, P., Dawilai, S., Svasti, S., Chasri, K., Tuntipopipat, S., 2012. *Eryngium foetidum* Suppresses Inflammatory Mediators Produced by Macrophages. Asian Pacific J. Cancer Prev. 13, 653–664. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.2.653>
- Meyers, J.R., 2018. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. Curr. Protoc.

- Essent. Lab. Tech. 16, e19. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Mills, E.L., O'Neill, L.A., 2016. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur. J. Immunol.* 46, 13–21. <https://doi.org/10.1002/eji.201445427>
- Nguyen, T.H., Le, H.D., Nguyen Thi Kim, T., Pham The, H., Nguyen, T.M., Cornet, V., Lambert, J., Kestemont, P., 2020. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of the Ethanol Extract of *Clerodendrum Cyrtophyllum Turcz* in Copper Sulfate-Induced Inflammation in Zebrafish. *Antioxidants* 9, 192. <https://doi.org/10.3390/antiox9030192>
- Ni, H., Peng, L., Gao, X., Ji, H., Ma, J., Li, Y., Jiang, S., 2019. Effects of maduramicin on adult zebrafish (*Danio rerio*): Acute toxicity, tissue damage and oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.040>
- Nie, G., Jin, C., Cao, Y., Shen, S., Zhao, B., 2002. Distinct Effects of Tea Catechins on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 84–90. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2636>
- Padilla, S., Glaberman, S., 2020. The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing, in: *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*. Elsevier, pp. 525–532. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813602-7.00037-5>
- Paul, J.H.A., Seaforth, C.E., Tikasingh, T., 2011. *Eryngium foetidum* L.: A review. *Fitoterapia* 82, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.010>
- Pereira, T.C.B., Campos, M.M., Bogo, M.R., 2016. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *J. Appl. Toxicol.* 36, 876–885. <https://doi.org/10.1002/jat.3303>
- Phillips, J.B., Westerfield, M., 2014. Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis. Model. Mech.* 7, 739–743. <https://doi.org/10.1242/dmm.015545>
- Polednik, K.M., Koch, A.C., Felzien, L.K., 2018. Effects of Essential Oil from *Thymus vulgaris* on Viability and Inflammation in Zebrafish Embryos. *Zebrafish* 15, 361–371. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1519>
- Prabha, S.; Athoibi, S.; DSouza, M.R., 2019. Pharmacognostical evaluation of Spiny coriander (*Eryngium foetidum* L.): A traditional culinary and ethnomedicinal herb. *Int. J. Bot. Stud.* 4, 64–70.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Promtes, K., Kupradinun, P., Rungsipipat, A., Tuntipopipat, S., Butryee, C., 2016.

- Chemopreventive Effects of *Eryngium foetidum* L. Leaves on COX-2 Reduction in Mice Induced Colorectal Carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 68, 144–153. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1115103>
- Raunelli, P., Liviác, D., Alvis, R., Puente, S., Best, I., Reátegui, O., 2019. Cytoprotective Effect of the *Eryngium foetidum* “Sacha Culantro” Methanolic Leaf Extract Versus Sodium Fluoride Exposed Mice using the Micronucleus Test and the Comet Assay. *Pharmacogn. J.* 11, 461–465. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.72>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E., 2015. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Med. Res. Rev.* 35, 877–936. <https://doi.org/10.1002/med.21347>
- Rodrigues, T.L.M., Castro, G.L.S., Viana, R.G., Gurgel, E.S.C., Silva, S.G., de Oliveira, M.S., Andrade, E.H. de A., 2020. Physiological performance and chemical compositions of the *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae) essential oil cultivated with different fertilizer sources. *Nat. Prod. Res.* 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1795653>
- Rosales, C., 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Saenz, M. T.; Fernandez, M. A.; Garcia, M.D., 1997. Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L.(Apiaceae). *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Med. Sci. Res. Plants Plant Prod.* 11, 380–383. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199708\)11:5<380::AID-PTR116>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199708)11:5<380::AID-PTR116>3.0.CO;2-#)
- Saucedo-Vence, K., Dublán-García, O., López-Martínez, L.X., Morachis-Valdes, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., 2015. Short and long-term exposure to diclofenac alter oxidative stress status in common carp *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology* 24, 527–539. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1401-9>
- Shavandi, M. A.; Haddadian, Z.; Ismail, M.H.S., 2012. *Eryngium foetidum* L. *Coriandrum sativum* and *Persicaria odorata* L.: a review. *J. Asian Sci. Res.* 2, 410–426.
- Silalahi Marina, 2021. Essential oils and uses of *Eryngium foetidum* L. *GSC Biol. Pharm. Sci.* 15, 289–294. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.15.3.0175>
- Singh, S., Singh, D.R., Banu, S., Salim, K.M., 2013. Determination of Bioactives and Antioxidant Activity in *Eryngium foetidum* L.: A Traditional Culinary and Medicinal Herb. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 83, 453–460. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0141-y>
- Singh, S., Singh, D.R., Salim, K.M., Srivastava, A., Singh, L.B., Srivastava, R.C., 2011. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in

- traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62, 765–773. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.585961>
- Song, Y., Zhu, L.S., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W., Xie, H., 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol. Biochem.* 41, 905–909. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.009>
- Thi, N.Q.N., An, T.N.T., Nguyen, O.B., Dung, L.T., Minh, L. V, Nhan, L.T.H., 2020. Phytochemical Content and Antioxidant activity in aqueous and ethanolic extracts of *Eryngium foetidum* L. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 991, 012026. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012026>
- Thomas, P., Essien, E., Ntuk, S., Choudhary, M., 2017. *Eryngium foetidum* L. Essential Oils: Chemical Composition and Antioxidant Capacity. *Medicines* 4, 24. <https://doi.org/10.3390/medicines4020024>
- Tripathi, Parul, Tripathi, Prashant, Kashyap, L., Singh, V., 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>
- Udaya, S., Babu, N., Nanjappa, D.P., Kalladka, K., Chakraborty, G., Chakraborty, A., 2020. Evaluation of Toxicity and Antioxidant Property of *Cassia fistula* Stem Bark Extracts in Zebrafish. *J. Heal. Allied Sci. NU* 10, 109–115. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715995>
- Wang, W., Fang, S., Xiong, Z., 2019. Protective effect of polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong* hort against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in zebrafish embryo. *Carbohydr. Polym.* 221, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.087>
- Xiong, G., Deng, Y., Cao, Z., Liao, X., Zhang, J., Lu, H., 2019a. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 95, 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.040>
- Xiong, G., Zou, L., Deng, Y., Meng, Y., Liao, X., Lu, H., 2019b. Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.002>
- Yang, Y., Zheng, K., Mei, W., Wang, Y., Yu, C., Yu, B., Deng, S., Hu, J., 2018. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an in vivo zebrafish model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.071>
- Yuhlung, C. C., & Bhattacharyya, M., 2014. Practice of Ethno-medicine among the Chothe Tribe of Manipur, North-East India. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 5.
- Zampieri, R.M., Adessi, A., Caldara, F., Codato, A., Furlan, M., Rampazzo, C., De Philippis,

- R., La Rocca, N., Dalla Valle, L., 2020. Anti-Inflammatory Activity of Exopolysaccharides from *Phormidium* sp. ETS05, the Most Abundant Cyanobacterium of the Therapeutic Euganean Thermal Muds, Using the Zebrafish Model. *Biomolecules* 10, 582. <https://doi.org/10.3390/biom10040582>
- Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Su, J., Yu, C., 2011. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 26, 480–488. <https://doi.org/10.1002/tox.20575>

## Legendas das Figuras

**Figura 1.** Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST em embriões/larvas de zebrafish a 96hpf nos grupos tratados com  $H_2O_2$  e os tratados com os extratos de *Eryngium foetidum*. (A, D, G) aquoso (EA), (B, E, H) etanólico (EE) e (C, F, I) metanólico (EM). As barras indicam a média  $\pm$  SEM de três repetições (n = 3). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) entre os grupos.

**Figura 2.** Efeitos protetores dos extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e metanólico (EM) de *Eryngium foetidum* durante a apoptose celular induzida por  $H_2O_2$  em embriões/larvas de zebrafish. Os níveis de apoptose foram medidos após coloração com laranja de acridina por análise de imagem e microscópio de fluorescência. Micrografias de fluorescência representativas do nível de apoptose e os dados obtidos de análises de intensidade de fluorescência individuais de zebrafish usando o software ImageJ são mostrados como gráficos de barras. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) entre os grupos em comparação com o grupo tratado com peróxido de hidrogênio.

**Figura 3** O tratamento com os extratos de *Eryngium foetidum* reduziram a migração de neutrófilos para o local da lesão na nadadeira caudal de larvas de *Danio rerio*. (A) representação esquemática do corte na nadadeira caudal; micrografias representativas (B) controle (C) tratadas com  $0,156 \text{ mg mL}^{-1}$  de EE (extrato etanólico).

**Figura 4** Efeitos anti-inflamatórios dos extratos de *Eryngium foetidum* após lesão na nadadeira caudal de larvas de zebrafish (*Danio rerio*). (A) aquoso (EA), (B) etanólico (EE) e (C) metanólico (EM). O número de neutrófilos no local da ferida foi contabilizado a 6 hpi (horas pós injúria) As experiências foram realizadas em (n = 15) por tratamento e os dados são expressos como média  $\pm$  SE. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) entre os grupos.

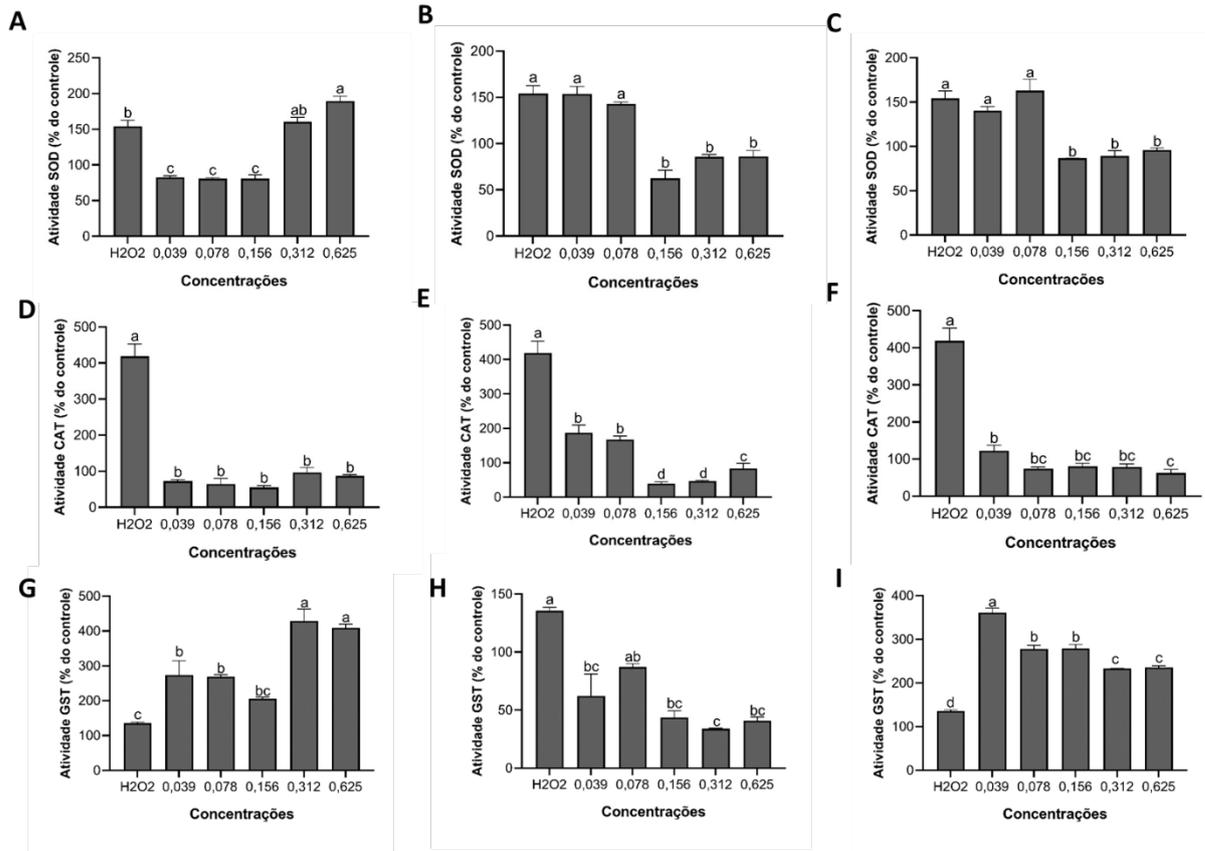


Figura 1.

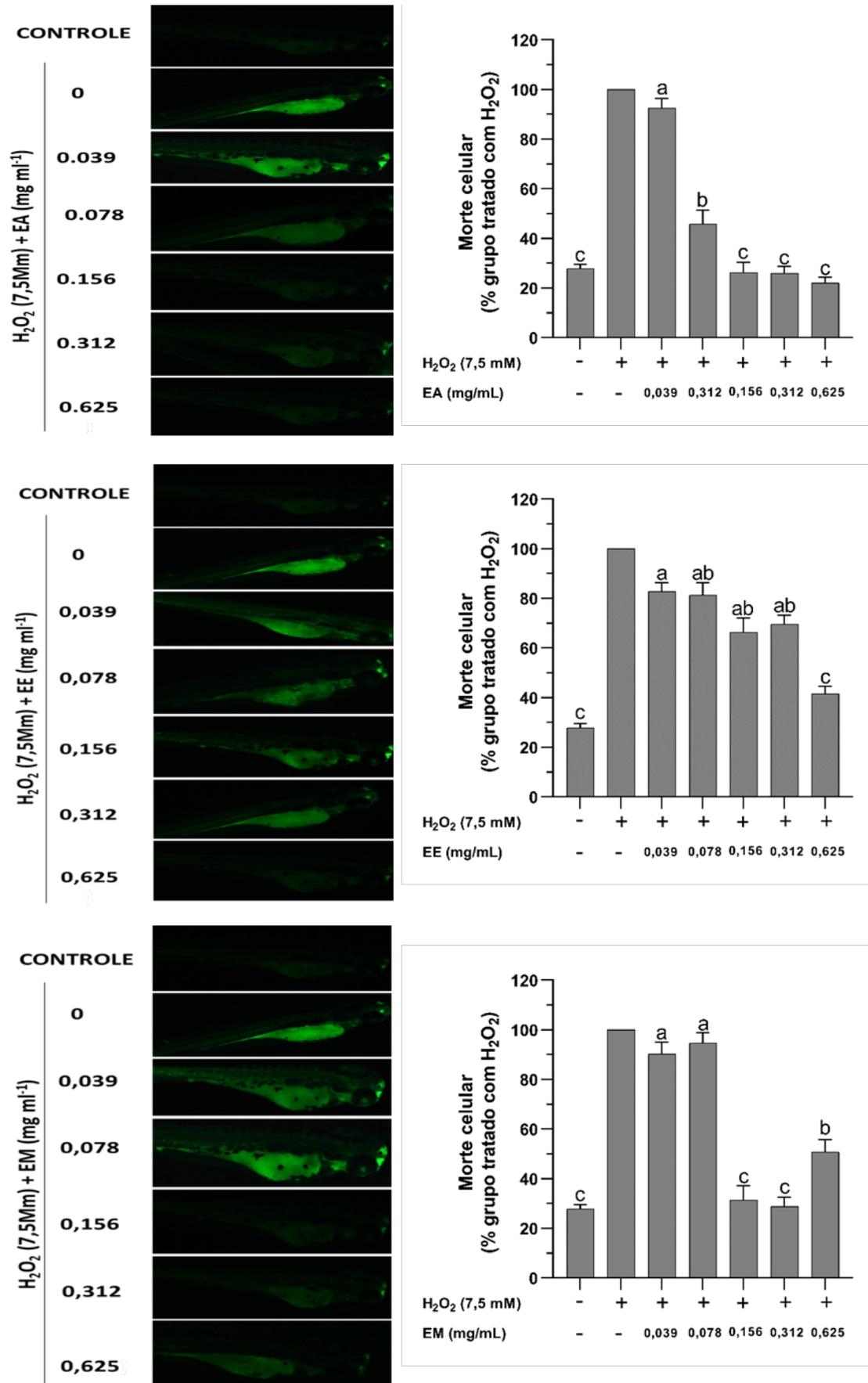
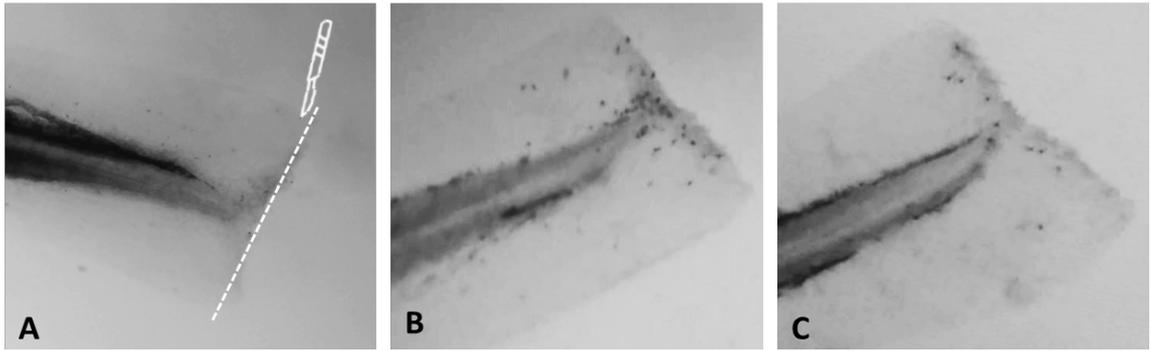
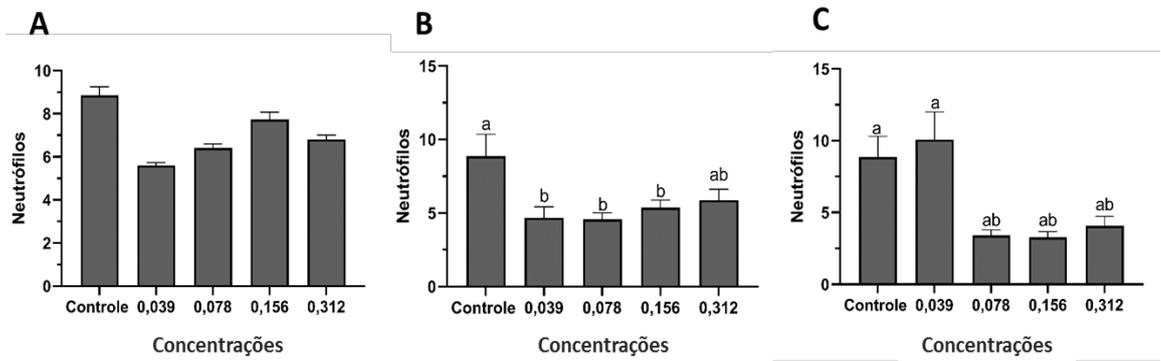


Figura 2.



**Figura 3.**



**Figura 4.**