



UNIVERSIDADE FEEVALE

**MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS**

Plantas medicinais: toxicidade *in vitro* versus avaliação do estresse oxidativo
em doentes crônicos

Tainara Vargas de Oliveira

Linha de Pesquisa: Toxicologia Humana e Análises Toxicológicas

Orientador: Magda Susana Perassolo

Coorientador: Ana Luiza Ziulkoski

Novo Hamburgo, fevereiro de 2020

TAINARA VARGAS DE OLIVEIRA

**PLANTAS MEDICINAIS: TOXICIDADE *IN VITRO* VERSUS AVALIAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENTES CRÔNICOS**

Dissertação apresentada para
obtenção do GRAU DE
MESTRE em Toxicologia e
Análises Toxicológicas pela
Universidade Feevale.

Orientador: Magda Susana Perassolo

Coorientador: Ana Luiza Ziulkoski

Novo Hamburgo, fevereiro de 2020

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Oliveira, Tainara Vargas de.

Plantas medicinais : toxicidade in vitro versus avaliação do estresse oxidativo em doentes crônicos / Tainara Vargas de Oliveira. – 2020.

78 f. ; il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2020.

Inclui bibliografia e anexos.

“Orientador: Magda Susana Perassolo ; Coorientador: Ana Luiza Ziulkoski”.

1. Estresse oxidativo. 2. Plantas medicinais. 3. Doença crônica não transmissível. 4. Citotoxicidade. I. Título.

CDU 633.88

Bibliotecária responsável: Janice Moser Corrêa – CRB 10/2315

TAINARA VARGAS DE OLIVEIRA

Dissertação intitulada *Plantas medicinais: toxicidade in vitro versus avaliação do estresse oxidativo em doentes crônicos*, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Universidade Feevale, como requisito necessário para obtenção do grau de mestre.

Aprovado por:

Orientadora: Prof. Dra Magda Susana Perassolo
Universidade Feevale

Prof. Dra. Juliane Deise Fleck
Banca Examinadora
Universidade Feevale

Prof. Dra. Rejane Giacomelli Tavares
Banca Examinadora
Universidade Federal de Pelotas

Novo Hamburgo, fevereiro de 2020.



DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos
meus amados pais Laerte e
Sandra, ao meu irmão Lucas,
ao meu amado esposo
Tiago, por todo carinho,
paciência, amor e cuidado.*

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde para realizar este trabalho.

Agradeço aos meus pais Laerte e Sandra, pelos ensinamentos recebidos, por todo o incentivo e suporte em minha vida, e ao meu irmão Lucas, que juntamente me ajudou nesta fase.

Agradeço ao meu esposo Tiago por me sustentar em todas as áreas e pela sua disposição em me ajudar dia a dia, sempre me apoiando e me dando forças para continuar.

Agradeço ao grupo de pesquisa e toda equipe do Laboratório de citotoxicidade da Universidade Feevale, por toda a ajuda durante este período e a cada colega que fez parte dessa jornada.

Agradeço as minhas colegas farmacêuticas Tatiele e Graciela, por entenderem este meu tempo de estudo, me ajudando diariamente de diversas formas.

Agradeço as minhas orientadoras Magda Susana Perassolo e Ana Luiza Ziulkoski, por toda a ajuda e paciência nesta caminhada acadêmica, são exemplos para mim.

Muito obrigada!

E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.

Romanos 8:28 – Bíblia Sagrada

RESUMO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) constituem problema de saúde de grande magnitude, entre os processos fisiológicos associados a DCNT, o estresse oxidativo (EO) está presente. Algumas plantas medicinais (PMs) têm sido empregadas no tratamento de DCNT. Entretanto, grande parte das PMs utilizadas pela população não tem seus perfis toxicológicos bem conhecidos. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a toxicidade das PMs utilizadas para fins medicinais em portadores de DCNT através de ensaios de EO e a citotoxicidade dos infusos. Participaram do estudo 150 indivíduos todos portadores de uma ou mais DCNT, destes, 112 voluntários faziam o uso de algum tipo de PMs, e 38 voluntários não eram usuários de nenhum tipo de PMs. Maior prevalência do gênero feminino com idade média de 62 ± 10 anos, em ambos os grupos. As PMs mais relatadas pelos voluntários foram o *Cymbopogon citratus* (42%), *Matricaria chamomilla* (39%), *Mentha pulegium* (25%) e *Achyrocline satureoides* (18%). Com base nos resultados obtidos, observamos que grande parte dos doentes crônicos utilizam PMs, nos pacientes diabéticos os níveis de catalase foram menores e os níveis malondialdeído maiores, comparado aos pacientes não portadores. A utilização de *M. chamomilla* aumentou os níveis das enzimas antioxidantes, sugerindo uma atividade mais pronunciadas de proteção contra o EO. Entretanto, a citotoxicidade aumenta de forma dose-dependente nas quatro espécies analisadas, sugere-se que o uso crônico destas PMs está associado a danos celulares. Analisar extratos brutos, ou seja, na forma que são principalmente consumidos pela população, se torna importante para delinear o perfil toxicológico das PMs.

Palavras-chave: estresse oxidativo, plantas medicinais, doença crônica não transmissível, citotoxicidade

ABSTRACT

Chronic noncommunicable diseases (NCDs) constitute a major health problem, with oxidative stress (OE) among the physiological processes involved. Some medicinal plants (MPs) have been used to treat NCDs. However, most MPs consumed by the population do not have well-known toxicological profiles. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of plant species used for medicinal purposes by patients with NCDs through OE and cytotoxicity assays. The study included 150 participants, all of them with one or more NCDs. Of these, 112 volunteers used some type of MP and 38 were not users of any type of MP. In both groups, the average age was 62 ± 10 years and there was higher prevalence of females. The most consumed MPs were *Cymbopogon citratus* (42%), *Matricaria chamomilla* (39%), *Mentha pulegium* (25%) e *Achyrocline satureoides* (18%). Based on the results of the study, many chronic patients use MPs. In diabetic patients, the levels of catalase were lower and the levels of malondialdehyde were higher, compared to non-diabetic patients. The use of *M. chamomilla* increased the levels of antioxidant enzymes, suggesting a more pronounced protection against OE. However, the cytotoxicity increased in a dose-dependent manner for all four species analyzed, suggesting that the chronic use of these MPs is associated with cell damage. Analyzing the crude extracts, which is the main form they are consumed by the population, is essential to outline the toxicological profile of MPs.

Keywords: oxidative stress, medicinal plants, chronic noncommunicable disease, cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT - Catalase

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DCNT - doenças crônicas não transmissíveis

EO - Estresse oxidativo

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FRAP - Ferric reducing antioxidant power

GPx - Glutationa peroxidase

IFN – Interferon

IL – Interleucinas

MDA - Malondialdeído

MTT - (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio)

NIH – 3T3 - Células oriundas de fibroblastos de tecido embrionário de camundongo

OECD - Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PMs - Plantas medicinais

PNPICS - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS

SOD - Superóxido dismutase

SRB - Sulforrodamina B

SUS – Sistema único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF – Fator de necrose tumoral

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO GERAL	12
2 INTRODUÇÃO GERAL	14
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4 CAPÍTULO 1	19
5 CAPÍTULO 2	19
6 CAPÍTULO 3	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67
ANEXO I	69
ANEXO II	71
ANEXO III	73
ANEXO IV	77

1 APRESENTAÇÃO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a toxicidade de espécies vegetais utilizadas para fins medicinais em portadores de doenças crônicas não transmissíveis, como hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemias entre outras, através de ensaios de estresse oxidativo e citotoxicidade.

Essa dissertação inicia com uma breve revisão bibliográfica sobre a temática desenvolvida, seguida da apresentação de dois capítulos compostos de artigos científicos encaminhados para publicação em revistas distintas, como abaixo citado:

CAPÍTULO 1: Manuscrito será submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*, intitulado “*Evaluation of the oxidative stress profile of chronic patients users of medicinal plants*”. Os pesquisadores que participaram deste trabalho são: Tainara Vargas de Oliveira, César Augusto Miorelli Campos, Bruna Scherer Seibert; Juliana Raquel Raasch, Larissa Selbach Dries, Ana Luiza Ziulkoski e Magda Susana Perassolo.

CAPÍTULO 2: Manuscrito será submetido ao *Toxicology and Applied Pharmacology*, intitulado “*Cytotoxicity of Achyrocline satureoides, Cymbopogon citratus, Matricaria chamomilla and Mentha pulegium infusions in 3T3 cell line*”. Os pesquisadores que participaram deste trabalho são: Tainara Vargas de Oliveira, Natasha da Rosa Silva, Amanda Schu Ponath, Alana Witt Hansen Ana Luiza Ziulkoski e Magda Susana Perassolo.

CAPÍTULO 3: Resultados parciais. Intitulado “*Avaliação de citocinas séricas envolvidas com resposta inflamatória em doentes crônicos usuários de plantas medicinais*”. Os pesquisadores que participaram deste trabalho são: Tainara Vargas de Oliveira, Alana Witt Hansen, Ana Luiza Ziulkoski e Magda Susana Perassolo.

Em adição aos manuscritos citados anteriormente, durante a realização desta pesquisa os trabalhos abaixo foram apresentados em eventos científicos, a saber:

- “Evaluation of serum cytokines in chronic patients users of medicinal plants”. Apresentado na forma de resumo no 17th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology.
- “Avaliação da toxicidade *in vitro* de infuso de macela (*Achyrocline satureoides*) em células 3T3”. Apresentado na forma de resumo expandido no Seminário de Pós-Graduação - Inovamundi 2019, da Universidade Feevale.
- “Avaliação da utilização de plantas medicinais em moradores de Novo Hamburgo”. Apresentado na forma de resumo na Feira de Iniciação Científica - Inovamundi 2019, da Universidade Feevale.
- “Avaliação da qualidade de vida em portadores de doenças crônicas da região do Vale do Sinos”. Apresentado na forma de resumo na Feira de Iniciação Científica - Inovamundi 2019, da Universidade Feevale.
- “Interações farmacológicas em pacientes da rede pública de saúde”. Apresentado na forma de resumo na Feira de Iniciação Científica - Inovamundi 2019, da Universidade Feevale.
- “Triagem Fitoquímica e Investigação do Potencial Antioxidante Total *in vitro* dos Infusos de *Achyrocline satureoides*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla* e *Mentha pulegium*”. Apresentado na forma de resumo na Feira de Iniciação Científica - Inovamundi 2019, da Universidade Feevale.
- “Toxicidade *in vitro* do infuso de *Mentha pulegium* em células 3T3”. Apresentado na forma de resumo na Feira de Iniciação Científica - Inovamundi 2019, da Universidade Feevale.
- “Avaliação dos níveis de estresse oxidativo em doentes crônicos usuários de plantas medicinais da região do Vale do Sinos”. Apresentado na forma de resumo expandido no Seminário de Pós-Graduação - Inovamundi 2018, da Universidade Feevale.

2 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde – World Health Organization (WHO), estima-se que 41 milhões de mortes ocorreram devido a doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). A maioria das mortes foram causadas pelas quatro principais DCNT, a saber: doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes. O controle e a prevenção das DCNT se tornaram uma prioridade das políticas públicas de saúde (MALTA et al., 2017; WHO, 2018).

Este quadro é uma realidade mundial, as DCNT constituem o maior problema global de saúde e têm gerado elevado número de mortes prematuras, perda de qualidade de vida, com alto grau de limitação e incapacidade (MALTA et al., 2014). O monitoramento e intervenções no manejo dessas doenças e seus fatores de risco, são essenciais para alcançar a meta global estipulada pela WHO, onde incluem a redução relativa de 25% no risco de mortalidade prematura por DCNT até 2025, e a redução de um terço até 2030 (WHO, 2018; MALTA et al., 2017).

Além dos medicamentos utilizados no controle de DCNT, é muito comum pacientes realizarem a utilização de plantas medicinais (PMs) junto ao tratamento medicamentoso, ou até mesmo tratar suas doenças a base de chás. O uso de PMs é uma prática que sempre esteve presente na vida do ser humano. Desde a antiguidade se tem relatos sobre o seu uso, sendo uma fonte valiosa de moléculas com potencial terapêutico (ATANASOV et al. 2015). Essa prática é respeitada por entidades nacionais como o Ministério da Saúde, e internacionais como a WHO (ZENI et al., 2016).

Atualmente, estima-se que cerca de 80% da população mundial faça uso de plantas ou de suas preparações. No Brasil, a regulamentação do uso de PMs e da Fitoterapia junto ao SUS iniciou-se em 2006 com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPICS) (BRASIL, 2018; BRASIL, 2006).

Alguns facilitadores para a alta incidência de uso de PMs são a grande diversidade vegetal encontrada no Brasil, o baixo custo associado à terapêutica,

e o fato de grande parte da população cultivar certas espécies de PMs em seus próprios quintais. Em contrapartida, um dos pontos mais preocupantes é a associação que a população faz entre a utilização de PMs e a ausência de risco, por serem naturais e então não fazerem mal à saúde (SANTOS et al., 2011; ZENI et al., 2016), quando na verdade o uso de PMs pode não ser inofensivo.

As condições patológicas oriunda das DCNT, estão associadas a um aumento da carga inflamatória. A inflamação é um mecanismo de proteção empregado contra antígenos endógenos e exógenos. As células do sistema imunológico, como as citocinas estão envolvidas diretamente no processo da inflamação crônica. Entre as citocinas algumas possuem características pró-inflamatórias como, por exemplo, IL1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF, IFN e IL-17, estas são necessárias para se iniciar e perpetuar a resposta inflamatória. Outras citocinas são anti-inflamatórias como, por exemplo, IL-4, IL-10 e IL-13 estas auxiliam na resolução da inflamação e cicatrização da lesão (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009; PERNAMBUCO, 2014; PICKERING et al., 2018).

O desequilíbrio entre a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias pode ser o responsável pelo desencadeamento e manutenção dos sintomas de condições crônicas. Estudos relatam sobre o papel importante deste mecanismo no desenvolvimento de doenças como diabetes, dislipidemias e câncer, visto que, quando a inflamação se torna crônica, pode configurar-se um indicativo de condição patológica, caracterizada pela resposta contínua da inflamação e consequentemente gerando destruição tecidual (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009; PERNAMBUCO, 2014; PICKERING et al., 2018).

O estresse oxidativo (EO) é considerado uma das principais causas de vários distúrbios crônicos e um dos fatores determinantes em diversas fisiopatologias. O EO ocorre a partir de um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamados de radicais livres e a capacidade antioxidante endógena. De modo que esse desequilíbrio oxidante-antioxidante pode levar a morte celular (LUCA e LUCA, 2013; RANG et al., 2016, BERNATONIENE; KOPUSTINSKIENE, 2018).

Alguns estudos sugerem que o dano causado pelo EO seja um fator de risco comum para vários distúrbios inflamatórios, por induzir reações

inflamatórias, através das interações das EROs com proteínas, DNA, carboidratos e lipídeos, conduzindo à oxidação das mesmas e levando à perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrios, cuja manifestação é o dano celular (LUTFIOĞLU, 2017).

Entretanto, quando a produção de EROs é exacerbada, o organismo fornece respostas celulares, através de sistemas de defesa antioxidante. Existe uma grande variedade de antioxidantes naturais que neutralizam as EROs e previnem o dano oxidativo nas membranas biológicas. São exemplos de enzimas antioxidantes endógenas a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Em adição às enzimas, existem também antioxidantes naturais, muitos deles presentes em alimentos, como: vitaminas A, C, E, carotenoides e flavonoides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LIU et al., 2006; REIS et al., 2008).

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como um dos responsáveis por maior capacidade antioxidante. Além desses compostos, vários outros com atividade antioxidante têm sido isolados de diversas famílias de plantas. De acordo com a literatura, estudos mostram que componentes extraídos de plantas têm sido estudados quanto ao seu potencial antioxidante, demonstrando alta eficiência. Porém são poucas pesquisas mostrando o efeito tóxico ou relacionados à segurança destas substâncias naturais (AQUINO et al., 2017).

Ensaios de toxicidade *in vitro* apresentam várias vantagens, pois envolvem pequenas configurações que permitem a utilização de pouca quantidade da substância de teste, alto número de repetições, bem como facilidade de interpretação dos resultados obtidos. Os métodos *in vitro* são úteis para elucidar os mecanismos de toxicidade de uma substância de teste (ERHIRHIE; IHEKWEREME; ILUDIGWE, 2017).

No Brasil, métodos alternativos ao uso de animais, são reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Resolução nº 18/2014. Tendo em vista a aplicação do princípio dos 3Rs, com finalidade de redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa (BRASIL, 2014).

Entre os ensaios empregados para a determinação de citotoxicidade ou viabilidade celular após a exposição a substâncias potencialmente tóxicas, destacam-se o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il] 2,5-difeniltetrazólio), e o ensaio de adsorção da sulforrodamina B (SRB). Ambos os ensaios utilizam medições colorimétricas para definir o número de células viáveis após exposição a xenobióticos (GRACIOLI, 2013; VAJRABHAYA; FIGUEIRÓ et al., 2017; KORSUWANNAWONG, 2018).

Para a realização destes ensaios, é preconizado pelas Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), a qual possuem aceitação regulatória internacional, a utilização de células oriundas de fibroblastos de tecido embrionário de camundongo NIH-3T3 (OECD, 2010).

3 OBJETIVOS

Apresentam-se, a seguir, os objetivos propostos para o estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade de espécies vegetais utilizadas para fins medicinais em portadores de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), através de ensaios de estresse oxidativo (EO) e citotoxicidade em modelo experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer um levantamento das DCNT no grupo de voluntários atendidos nas clínicas da Feevale e nas Unidades Básicas de Saúde de Novo Hamburgo;
- Fazer um levantamento das PMs mais utilizadas pelos voluntários do estudo;
- Identificar as quatro espécies de PMs mais citadas pelos voluntários;
- Estimar a toxicidade do infuso das quatro espécies de PMs mais utilizadas através de ensaios de viabilidade celular em células 3T3;
- Determinar os níveis de EO em portadores de DCNT que fazem o uso de PMs e em portadores de DCNT que não fazem o uso de PMs através de dosagens das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, além do Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP, do inglês, *ferric reducing antioxidant power*) e do biomarcador MDA.

4 CAPÍTULO 1

Evaluation of the oxidative stress profile of chronic patients users of medicinal plants

Tainara Vargas de Oliveira^{1,2}, César Augusto Miorelli Campos^{1,2}, Bruna Scherer Seibert¹, Juliana Raquel Raasch³, Larissa Selbach Dries^{1,3}, Edna Sayuri Suyenaga⁴, Ana Luiza Ziulkoski⁴, Magda Susana Perassolo^{4*}.

¹Bachelor in Pharmacy, University Feevale.

²MSc. Student in Toxicology and Analytical Toxicology, University Feevale.

³MSc. in Toxicology and Analytical Toxicology, University Feevale.

⁴Professor at University Feevale, collaborator on the program of MSc. in Toxicology and Analytical Toxicology.

Corresponding author:

Magda Susana Perassolo

Institute of Health Sciences, University Feevale

2755 ERS 239 - Vila Nova

Postal code 93525-075, Novo Hamburgo – RS, Brazil

E-mail: magdaperassolo@feevale.br

ABSTRACT

Chronic noncommunicable diseases (NCDs) constitute a major health problem, with oxidative stress (OE) among the physiological processes involved. Some medicinal plants (MPs) have been used to treat NCDs. However, most MPs consumed by the population do not have well-known toxicological profiles. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of plant species used for medicinal purposes by patients with NCDs through OE assays. This study included 150 participants, all of them with one or more NCD. Of these, 112 volunteers used some type of MP and 38 were not users of any type of MP. In both groups, the average age was 62 ± 10 years and there was higher prevalence of females. The most consumed MPs were *Cymbopogon citratus* (42%), *Matricaria chamomilla* (39%), *Mentha pulegium* (25%) e *Achyrocline satureoides* (18%). Higher levels of superoxide dismutase (SOD) were observed in patients who did not make use of MPs, when compared to users ($p=0.002$). Hypertensive patients presented higher levels of SOD and lower levels of glutathione peroxidase (GPx), compared to non-hypertensive patients ($p=0.001$ and 0.003). In patients with depression, catalase (CAT) was increased and malondialdehyde (MDA) was decreased, compared to volunteers without this pathology ($p=0.021$ and 0.042). In diabetic patients, CAT levels were lower and MDA levels were higher, compared to non-diabetic patients ($p=0.009$ and 0.001). Users of *M. chamomilla* presented higher levels of CAT and SOD ($p=0.033$ and 0.026). *M. glomerata* users presented higher levels of GPx and lower levels of SOD ($p=0.041$ and 0.022). MDA was increased in users of *C. sicyoides* ($p=0.014$). Lower levels of SOD ($p=0.011$) were observed in users of *M. sylvestris*. Based on the results of this study, most chronic patients consume MPs and the use of *M. chamomilla* improves the levels of two antioxidant enzymes (CAT and SOD), suggesting a more pronounced antioxidant activity.

Keywords: chronic noncommunicable diseases, oxidative stress, medicinal plants.

1. INTRODUCTION

Chronic noncommunicable diseases (NCDs) are one of the greatest health problems globally as they have been collaborating for high incidences of death, loss of quality of life and high degrees of limitation and disability. Most deaths are caused by four most common NCDs, namely cardiovascular disease, cancer, chronic respiratory diseases and diabetes (WHO, 2018; MALTA et al., 2019).

The etiology of NCDs is multifactorial and strongly associated with metabolic alterations, characterized by physiological changes such as arterial hypertension, overweight, hyperglycemia and hyperlipidemia. These conditions lead to increased production of reactive oxygen species (ROS), also known as free radicals (MALTA et al., 2019; YARIBEYGI et al., 2018; WHO, 2018).

When there is an imbalance between the formation of ROS and antioxidant mechanisms, oxidative stress (OE) takes place increasing the oxidative damage to macromolecules such as lipids, DNA and proteins. Therefore, OE plays an important role in the progression of several pathologies, including NCDs (MANCINI et al., 2016; LIGUORI et al., 2018; YARIBEYGI et al., 2018).

Patients with NCDs frequently make use of medicinal plants (MPs) in combination with pharmaceutical treatment, or even treat their illnesses exclusively based on teas. The use of MPs is a longstanding practice with reports on their use since ancient times, thus MPs may be a valuable source of molecules with therapeutic potential (ATANASOV et al. 2015). However, one of the most worrying facts is that the population usually considers MPs harmless because they are natural products (SANTOS et al., 2011; ZENI et al., 2016), even though the use of MPs may not be harmless.

Considering this scenario, MPs represent a therapeutic alternative for a large share of the general population and for many patients with NCDs, which are usually users of polypharmacy. Thus, understanding the effects of MPs in the body of these patients is necessary to promote information and health.

As this is a complex subject with several hypotheses about OE in NCDs and because there are some discrepancies regarding the association or not of antioxidants with pharmacotherapy, studies in this area are of increasing interest. Thus, the aim of this study is to evaluate the toxicity of plant species used for medicinal purposes in patients with NCDs through OE assays.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. DATA COLLECTION

Patients attended at an integrated center of education in health of a post-secondary education institution in south Brazil were selected for participation in this study. Each patient was interviewed, starting with the signature of two copies of an informed consent form (TCLE) followed by a questionnaire about general characteristics and clinical data. The questionnaire comprised the evaluation of sociodemographic profile and aspects related to the use of MPs (types and parts of plants used, frequency of use, indication and preparation).

The group studied included volunteers above 18 years of age with one or more NCD, users of continuous medications in association or not with MPs, and with cognitive condition to answer the questionnaire. Patients not attending these criteria were excluded. The group studied was subdivided in two groups: group I, patients with NCDs users of MPs and group II, patients with NCDs not users of MPs. This study was approved by the Research Ethics Committee of Feevale University (CAAE 62834916.0.0000.5348) and was conducted in accordance with Resolution 466/2012 following the precepts of the Declaration of Helsinki.

2.2. LABORATORY DETERMINATIONS

After the interview, a venous blood sample was collected and plasma was obtained from whole blood by centrifugation. Aliquots were cryopreserved at -80°C until analysis. The OE profile was assessed using the determination of malondialdehyde (MDA) (ANTUNES et al, 2008). The antioxidant enzymes analyzed were extracellular superoxide dismutase (SOD) (indirect method of nitro tetrazolium blue - NBT), catalase (CAT) (AEBI, 1984) and glutathione peroxidase (GPx) (PAGLIA and VALENTINE, 1967). The determination of the total antioxidant capacity was carried out using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, which is based on the reduction of iron in biological fluids and compounds in aqueous solutions (BENZIE and STRAIN, 1996).

2.2.1 Malondialdehyde

Based on the method developed by Antunes et al. (2008), the determination of the biomarker malondialdehyde (MDA) starts with alkaline hydrolysis of the plasma in order to release the protein-bound fraction, subsequently precipitated by the addition of 15% HClO₄. Then, the sample is centrifuged at 12000 rpm, 4°C for 10 minutes. DNPH was added to 250 µL of the supernatant for derivatization and incubated at room temperature protected from light for 30 minutes.

Chromatographic analysis was performed by high performance liquid chromatography and diode-array detection (HPLC-DAD), with 50 µL of the prepared sample and mobile phase consisting of 0.2% (w/v) acetic acid: acetonitrile (62:38) at flow rate of 1 mL/min and monitoring at 310 nm.

2.2.2. Extracellular superoxide dismutase

The activity of extracellular superoxide dismutase (SOD) was determined with the commercial kit Fluka 19160 (Steinheim, Germany), based on the indirect method of nitro tetrazolium blue (NBT). This test uses xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to produce formazan, a compound that absorbs light at 450 nm.

The inhibition of chromogen production is proportional to the activity of SOD in patient plasma. The determination was performed on microplates by spectrophotometry and the results were expressed as SOD inhibition rate (%).

2.2.3 Catalase

Catalase (CAT) was determined using the method described by Aebi (1984). The red blood cells in the tube containing heparin, separated as described in sample processing, were washed with 0.9% NaCl solution 3 times. An aliquot of 1 mL of red blood cells was transferred to another tube and 4 mL of water (dilution 1) was added. Then, 40 µL of this solution was added to 1960 µL of phosphate buffer pH 7.0 (dilution 2).

The spectrophotometric reading was performed at 240 nm at times 0 and 15s. A blank was prepared for each sample, and the results were expressed in s corrected by the patient's hemoglobin.

2.2.4 Glutathione peroxidase

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using the method described by Pleban, Munyani, Beachum (1982). A reaction mixture was prepared and incubated for 5 minutes at 37°C. To determine the enzymatic activity in plasma, 50 µL of undiluted plasma was added to 950 µL of reaction solution. GPx activity was expressed in U/L of plasma.

To start the reaction, 10 µL of H₂O₂ 8.8 mmol/L was added and the decrease in NADPH levels was monitored for 3 minutes through the variation of absorbance at 340 nm. The blank tube was prepared by addition of water instead of plasma. After obtaining the results with the UV-Visible Spectrophotometer, calculations were performed according to the equation described by Faraji, Kang, Valentine (1987).

2.2.5 Total antioxidant capacity

The total antioxidant capacity was determined with the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, which consists in reduction of Fe⁺³ in biological fluids and compounds in aqueous solutions (BENZIE and STRAIN, 1996). To perform the test, working FRAP reagent was prepared by mixture of 0.3 M acetate buffer, 10 mM TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine and 20 mM aqueous solution of ferric chloride. A standard solution of ferrous sulfate was also prepared in dark room to determine the standard curve (500 to 2000 µM).

Patient plasma samples were analyzed in duplicates for greater precision. The absorbances obtained were plotted on a spreadsheet, and FRAP was calculated based on the linear equation obtained with the ferrous sulfate standard curve. The spectrophotometer reading was performed at 593 nm.

2.3. STATISTICAL ANALYSIS

All results were analyzed using SPSS® 25.0. Student t-test or Mann-Whitney U test were used to compare groups. Differences were considered significant if p <0.05.

3. RESULTS

The group studied consisted of 150 subjects, with higher prevalence of females. Group I included 112 volunteers with one or more NCD and who used some type of MP; group II included 38 volunteers with one or more NCD, but not users of any type of MP. Table 1 summarizes the characteristics of the participants of the study. There was no statistical difference considering the investigated variables between the groups.

Table 1. General characteristics, sociodemographic and clinical data of the 150 participants of the study.

Characteristic	Frequency per group	
	Group I (n = 112)	Group II (n = 38)
Gender		
Female	100 (89%)	27 (71%)
Male	12 (11%)	11 (29%)
Age (years)	62 ± 10	63 ± 11
BMI (kg/m²)¹	28.6 ± 5.4	27.4 ± 5.5
SBP (mmHg)²	122 ± 14	123 ± 9
DBP (mmHg)³	79 ± 11	79 ± 7
Education		
Incomplete elementary education	62 (55%)	14 (37%)
Complete elementary education	26 (23%)	14 (37%)
Incomplete high school	9 (8%)	3 (8%)
Complete high school	13 (12%)	7 (18%)
Post-secondary education	2 (2%)	0
Income (MW)⁴		
1 MW	48 (43%)	12 (32%)
1.5 MW	5 (4%)	1 (3%)
2 MW	34 (30%)	16 (42%)
2.5 MW	4 (3.5%)	2 (5%)
3 MW	17 (16%)	3 (8%)
+4 MW	4 (3.5%)	4 (10%)
Smoking		
No	96 (86%)	27 (71%)
Yes	7 (6%)	1 (8%)
Former smoker	9 (8%)	8 (21%)
Alcoholism		
Yes	0	0
No	112 (100%)	38 (100%)
Use of antioxidant		
Yes	37 (33%)	10 (26%)
No	75 (67%)	28 (74%)

Source: Elaborated by the author. Group I: patients with NCDs and user of MPs; Group II: patients with NCDs and not users of MPs; 1. Body mass index; 2. Systolic blood pressure; 3. Diastolic blood pressure; 4. Minimum wage. Statistical significance level p<0.05.

Each patient reported the NCDs present during the interviews. These data were confirmed through pharmaceutical records and laboratory tests when necessary. The NCDs of group studied are described in Table 2. Arterial hypertension was the most frequent NCD in both groups, followed by gastric discomfort, depression and dyslipidemia.

The most consumed MPs cited by the volunteers were: lemon grass (*C. citratus*, 42%), chamomile (*M. chamomilla*, 39%), pennyroyal (*M. pulegium*, 25%), macela (*A. satureioides*, 18 %), peppermint (*M. piperita*, 15%), Indian coleus (*P. barbatus*, 13%), guaco (*M. glomerata*, 10%), anise (*P. anisum*, 8%), princess vine (*C. sicyoides*, 5%) and mallow (*M. sylvestris*, 3%). The method of preparation mentioned by most patients was infusion, and the frequency of use varied from two to three times per week, or when necessary to treat some discomfort.

Table 2. Most prevalent chronic noncommunicable diseases in the group studied.

Chronic disease	Frequency per group	
	Group I (n = 112)	Group II (n = 38)
Arterial hypertension	67 (60%)	18 (47%)
Gastric discomfort	40 (36%)	18 (47%)
Depression	38 (34%)	16 (35%)
Dyslipidemia	35 (29%)	18 (47%)
Arthrosis	28 (25%)	6 (16%)
Diabetes Mellitus type 2	21 (19%)	9 (24%)
Hypothyroidism	17 (15%)	9 (24%)
Osteoporosis	13 (12%)	6 (16%)
Fibromyalgia	10 (9%)	0 (0%)

Source: Elaborated by the author. Group I: patients with NCDs and user of MPs; Group II: patients with NCDs and not users of MPs.

Analyzing the OE profile between groups, higher levels of SOD were observed in group II when compared to group I ($p=0.002$). There were no significant differences between the groups considering the other variables. The results are shown in Table 3.

Table 3. Evaluation of the oxidative stress parameters of the 150 volunteers studied.

VARIABLE	Group I (n = 112)	Group II (n = 38)	p
CAT (K/s)	0.68 (0.24 - 3.13)	0.39 (0.20 – 3.68)	0.340
FRAP (µM)	1265.8 (887.37 – 2107.2)	1469.13 (1236.56 – 1979.40)	0.224
GPx (U/L)	11.41 (0.84 – 101.25)	39.44 (0.17 – 173.0)	0.883
MDA (µM)	1.76 (1.33 – 1.51)	1.78 (1.32 – 2.36)	0.527
SOD (U/L)	143.56 (61.86 – 610.42)	579.86 (98.0 – 1400)	0.002*

Source: Elaborated by the author. Group I: patients with NCDs and user of MPs; Group II: patients with NCDs and not users of MPs; CAT – Catalase; FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power; GPx – Glutathione Peroxidase; MDA – Malondialdehyde; SOD - Superoxide Dismutase.

*Statistical significance level p<0.05; *Mann Whitney U test*; Data expressed as median, percentile 25 and 75.

Analyzing the NCDs against the parameters of OE, higher levels of SOD and lower levels of GPx were observed in hypertensive patients compared to non-hypertensive patients ($p=0.001$ and 0.003). In patients with depression, CAT levels were higher and MDA levels were lower, compared to patients without this pathology ($p=0.021$ and 0.042). In patients diagnosed with type 2 diabetes mellitus (DM2), CAT levels were lower and MDA levels were higher ($p =0.009$ and 0.001), compared to patients without DM2. No significant differences were observed for other NCDs. The values are described in Table 4.

Comparing the levels of OE with the use of MPs, users of *M. chamomilla* presented higher levels of CAT and SOD ($p=0.033$ and 0.026), compared to nonusers. Patients who reported the use of guaco (*M. glomerata*) presented higher levels of GPx ($p=0.041$) and lower SOD ($p=0.022$) compared to nonusers of this plant species. The lipid peroxidation marker MDA revealed higher levels in princess vine users (*C. sicyoides*) ($p=0.014$), compared to volunteers who did not use *C. sicyoides*. Lower levels of SOD ($p=0.011$) were found in mallow users (*M. sylvestris*), and a statistical tendency to lower FRAP levels and higher MDA values was observed in volunteers who used *M. sylvestris*, compared to the group that did not use this species. There were no significant differences for the other plants analyzed. The values are shown in Table 5.

Table 4. Evaluation of oxidative stress parameters according to the chronic noncommunicable diseases reported by the 150 volunteers studied.

OE NCD	ARTERIAL HYPERTENSION		DEPRESSION		DIABETES MELLITUS TYPE 2	
	Yes (n = 85)	No (n = 65)	Yes (n = 54)	No (n = 96)	Yes (n = 30)	No (n = 120)
CAT (K/s)	0.58 (0.3 – 4.0)	0.52 (0.1 – 1.9)	1.36 (0.4 – 4.0)	0.44 (0.16– 1.6)	0.34 (0.05– 0.7)	0.71 (0.24– 3.2)
	<i>p</i> = 0.221		<i>p</i> = 0.021*		<i>p</i> = 0.009*	
FRAP (μM)	1355 (974.0 – 2087.4)	1305.8 (822 – 1984.2)	1298 (1035.4 – 2067.6)	1322 (746.9 – 1984.2)	1218 (704.7 – 2131.9)	1330 (933.3 – 1984.8)
	<i>p</i> = 0.656		<i>p</i> = 0.558		<i>p</i> = 0.344	
GPx (U/L)	3.7 (0.2 – 88.8)	40.8 (3.3 – 173.0)	4.9 (0.4 – 88.9)	28.6 (0.8 – 169.6)	10.6 (0.4 – 94.2)	24.1 (0.7 – 143.7)
	<i>p</i> = 0.003*		<i>p</i> = 0.246		<i>p</i> = 0.798	
MDA (μM)	1.8 (1.4 – 2.5)	1.7 (1.3 – 2.2)	1.6 (1.3 – 2.0)	1.9 (1.4 – 2.5)	2.5 (1.5 – 3.2)	1.7 (1.3 – 2.2)
	<i>p</i> = 0.109		<i>p</i> = 0.042*		<i>p</i> = 0.001*	
SOD (U/L)	458.3 (71.4 – 1297.2)	77.3 (58.8 – 513.9)	450.0 (88.7 – 873.3)	113.9 (60.8 – 621.5)	78.8 (62.3 – 1187.5)	300 (62.3 – 700)
	<i>p</i> = 0.001*		<i>p</i> = 0.222		<i>p</i> = 0.465	

Source: Elaborated by the author. CAT – Catalase; FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power; GPx - Glutathione Peroxidase; MDA – Malondialdehyde; SOD - Superoxide Dismutase. *Statistical significance level *p*<0.05; *Mann-Whitney U test*; Data expressed as median, percentile 25 and 75.

Table 5. Evaluation of the oxidative stress parameters in users and nonusers of medicinal plants in the 150 volunteers studied.

	MPs	OE	CAT (K/s)	FRAP (µM)	GPx (U/L)	MDA (µM)	SOD (U/L)
Lemon grass <i>(C. citratus)</i>	Users (n = 63)	0.64 (0.2 – 4.6)	1288.6 (942.9 – 1997.8)	15.2 (0.52 – 101.3)	1.7 (1.4 – 2.5)	450 (64.3 – 700)	
	Nonusers (n = 87)	0.52 (0.2 – 1.9)	1357.5 (904.3 – 2080.8)	25.1 (0.4 – 139.7)	1.8 (1.32 -2.4)	300 (66.1 – 750)	
	p	0.210	0.915	0.790	0.933	0.766	
Chamomile <i>(M. chamomilla)</i>	Users (n = 59)	0.89 (0.3 – 4.6)	1253.3 (885 – 1978.2)	6.0 (0.8 – 101.3)	1.7 (1.3 – 2.4)	550 (89.6 – 700)	
	Nonusers (n = 91)	0.78 (0.3 – 4.2)	1389.6 (964 – 2139)	35.26 (0.46 – 173)	1.78 (1.33 – 2.53)	92.64 (61 – 675)	
	p	0.033*	0.124	0.765	0.597	0.026*	
Pennyroyal <i>(M. pulegium)</i>	Users (n = 37)	0.93 (0.3 – 6.3)	1253.3 (885 – 1978.2)	18.8 (0.8 – 96.9)	1.7 (1.3 – 2.4)	403 (64.3 – 693)	
	Nonusers (n = 113)	0.52 (0.2 – 2.3)	1389.6 (964 – 2139)	35.26 (0.5 – 173)	1.8 (1.33 – 2.53)	92.64 (61 – 675)	
	p	0.071	0.234	0.887	0.937	0.911	
Macela <i>(A. satureioides)</i>	Users (n = 27)	0.47 (0.3 – 1.9)	1595.4 (1000 – 2128)	4.1 (0.23 – 38.5)	1.7 (1.2 – 2.4)	250 (62 – 700)	
	Nonusers (n = 123)	0.58 (0.2 – 3.4)	1288.6 (886.7 – 1986.4)	26.3 (0.73 – 135.4)	1.8 (1.3 – 2.5)	324.8 (66 – 700)	
	p	0.849	0.216	0.100	0.459	0.893	

*Continues*Manuscript will be submitted to *Journal of Ethnopharmacology*

	OE	MPs				
		CAT (K/s)	FRAP (µM)	GPx (U/L)	MDA (µM)	SOD (U/L)
Guaco <i>(M. glomerata)</i>	Users (n = 15)	0.81 (0.17 – 3.9)	1680 (899 – 2047.8)	112.9 (12.2 – 173.1)	1.5 (1.2 – 2.3)	65.5 (58.6 – 488.9)
	Nonusers (n = 135)	0.53 (0.2 – 3.1)	1305.8 (942.9 – 1986.4)	10.6 (0.41 – 91.8)	1.8 (1.3 – 2.5)	394.4 (69.1 – 750)
	p	0.707	0.592	0.041*	0.262	0.022*
	Users (n = 8)	0.39 (0.1 – 0.7)	1388.7 (335.1 – 2167.5)	6.0 (0.35 – 45.0)	2.7 (1.7 – 3.2)	143.6 (66.8 – 433.3)
Princess vine <i>(C. sicyoides)</i>	Nonusers (n = 142)	0.59 (0.2 – 3.4)	1330 (961.5 – 1991.7)	20.9 (0.50 – 116.9)	1.75 (1.3 – 2.4)	369.4 (63.9 – 750)
	p	0.149	0.808	0.355	0.014*	0.366
	Users (n = 5)	0.64 (0.3 – 5.8)	1047.1 (654.6 – 1187.3)	2.7 (0.42 – 140.3)	3.6 (1.6 – 6.0)	59.3 (56.9 – 72.9)
	Nonusers (n = 145)	0.53 (0.21 – 3.2)	1357.5 (952.1 – 2064.3)	23.1 (0.54 – 107.1)	1.8 (1.3 – 2.4)	384.7 (66.3 – 725)
	p	0.679	0.085	0.630	0.073	0.011*

Source: Elaborated by the author. CAT – Catalase; FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power; GPx - Glutathione Peroxidase; MDA – Malondialdehyde; SOD - Superoxide Dismutase. *Statistical significance level p<0.05; *Mann-Whitney U test*; Data expressed as median, percentile 25 and 75.

4. DISCUSSION

The main findings of this study were (1) increased levels of SOD in volunteers nonusers of MPs; (2) higher SOD and lower GPx in patients with hypertension; (3) higher levels of CAT and lower levels of MDA in patients with depression; (4) decrease of CAT and increase of MDA in patients with diabetes; (5) higher levels of CAT and SOD in users of *M. chamomilla*; (6) higher GPx and lower SOD in users of *M. glomerata*; (7) higher levels of MDA among users of *C. sicyoides*; (8) lower levels of SOD in users of *M. sylvestris*.

The involvement of OE with chronic diseases is well documented in literature, as well as the role of antioxidant enzymes such as SOD in the removal of ROS, which has been suggested as a strategy to protect from oxidative damage (SINGH et al., 2017; KANG et al., 2018). In this study, it was possible to observe increased activity of SOD in chronic patients who did not make use of MPs when compared to users, suggesting a higher protection against OE in the first group.

Although some studies report that antioxidant phytochemicals may play a role in the treatment and prevention of NCDs, other studies have found discrepancies. It has been suggested that antioxidant supplementation may even play the opposite role (LIU, 2014; ZHANG et al., 2015).

The most prevalent NCD in this study was arterial hypertension. This corresponds with the Brazilian statistics of the 7th Brazilian Guideline on Hypertension (2017), which reports an incidence of hypertension equal to 32.5% in adults and above 60% in elderly, and contribution of the disease with 50% of the deaths due to cardiovascular disease. Comparing hypertensive and non-hypertensive patients, higher levels of SOD were observed in those who presented the pathology.

In the present study, it was also possible to observe increased levels of the antioxidant enzyme CAT and lower levels of the lipid peroxidation marker MDA in patients with depression. This result differs from Taene and colleagues (2019), whose study reported decreased antioxidant enzymes such as CAT, and a significant increased MDA levels in patients with depression compared to healthy volunteers.

This same profile was observed comparing diabetic and non-diabetic patients, with the first group presenting lower levels of CAT and increased MDA. This result is similar to other studies where MDA was higher in diabetic patients (CHATZIRALLI et al., 2017; DRIES et al., 2017).

The antioxidant enzymes SOD and CAT play an important role in the prevention of oxidative damage. In this study, patients who reported use of *M. chamomilla* presented increased levels of both enzymes. SOD catalyzes the conversion of superoxide to hydrogen peroxide (not a free radical, but a reactive molecule) and oxygen. CAT catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and protects tissues against reactive hydroxyl radicals (CEMEK et al., 2008). The results of this study suggest an improvement in the antioxidant defense of these patients due to the use of MPs. This data corroborates with other studies that reported the antioxidant action of *M. chamomilla* against OE, suggesting antioxidant activity due to the synergistic action of the phenolic compounds present in the plant (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2015; BIGAGLI et al., 2017; IONITA et al., 2018).

The species *M. glomerata*, commonly known as guaco, is usually used to treat respiratory diseases in Brazilian folk medicine. In the present study, users of this plant species presented lower serum levels of SOD and higher levels of GPx compared to nonusers, suggesting an alteration in the antioxidant defense. Fulanetti and colleagues (2016) analyzed the possible toxic effects of *M. glomerata* in Wistar pregnant rats, and concluded that changes such as toxicity, vasodilation and hypotension were not caused by guaco in the concentrations studied. However, higher doses must be analysed to determine the toxicological profile of this plant species. Another point to take into account is that there is another species in the genus *Mikania*, *M. laevigata*. *M. glomerata* and *M. laevigata* are often used and sold without distinction although their chemical compositions may differ (DELLA PASQUA et al., 2019).

Another finding of our study was the relation between the use of *M. sylvestris* and the decrease in antioxidant defense through reduction of the levels of SOD. Saad and colleagues (2016) evaluated the beneficial effects of *M. sylvestris* extract against kidney damage induced by lithium carbonate in male Wistar rats. In contrast with this study, the authors concluded that the administration of the extract of the leaves of *M. sylvestris* provided significant protection against oxidative damage by the increase in the activity of the enzymes SOD, CAT and GPx.

Our results show that users of *C. sicyoides*, popularly known in Brazil as 'vegetable insulin' and used to treat diabetes (DINIZ et al., 2018), presented higher levels of MDA compared to nonusers. Because MDA is a biological marker of oxidative damage, we can suggest that the OE profile is more pronounced in these patients due

to DM2, as MDA was higher in diabetic patients compared to non-diabetic patients, as mentioned previously.

Some limitations of the study should be mentioned, such as interference of eating habits and exercise on the OE profile. In relation to the MPs, the identification of the plant species was based on the spoken report of the patients, thus variations in the identification may be present.

Antioxidant treatment has been suggested to decrease OE (LIGUORI et al., 2018). However, to date, clinical studies investigating antioxidant supplements have not demonstrated any consistent benefit. Based on the results obtained, it is possible to affirm that the antioxidant mechanisms are influenced by several factors such as the use of MPs, pharmacotherapy, NCDs, food, smoking, among others.

5. CONCLUSIONS

Based on the data obtained in this study, a large number of chronic patients makes use some type of MP along with their treatment. The use of *M. chamomilla* improved the levels of two antioxidant enzymes (CAT and SOD), suggesting a more pronounced protection from OE. However, further studies are necessary to elucidate the interaction between MPs and NCDs. The use of MPs is a common practice in the population, therefore studies to prove their efficacy in humans are important, contributing to the determination of toxicity and long-term use profiles in patients with NCDs.

Funding: Feevale, Capes. This work has financial support by PPSUS public notice 03/2017 (CNPq and FAPERGS).

6. REFERENCES

- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, p. 121-126, 1984. Elsevier.
- ANTUNES, Marina Venzon et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Novo Hamburgo, v. 44, n. 2, p. 279-287, jun. 2008.
- BIGAGLI, Elisabetta et al. Pharmacological activities of an eye drop containing *Matricaria chamomilla* and *Euphrasia officinalis* extracts in UVB-induced oxidative stress and inflammation of human corneal cells. Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology, v. 173, p.618-625, ago. 2017.
- CEMEK, Mustafa et al. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal Of Natural Medicines, Turquia, v. 62, n. 3, p.284-293, 13 fev. 2008.
- CHATZIRALLI, Irini P. et al. The Effect of Vitamin E on Oxidative Stress Indicated by Serum Malondialdehyde in Insulin-dependent Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Retinopathy. The Open Ophthalmology Journal, Grecia, v. 11, n. 1, p.51-58, 31 mar. 2017.
- CHAUDHARY, Pritee et al. Association of oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. Analytical Biochemistry, India, v. 590, p.113535-113545, jan. 2020.
- DELLA PASQUA, Camila et al. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). Journal Of Ethnopharmacology, Campinas, v. 231, p.50-56, mar. 2019.
- DINIZ, Margareth de Fátima Formiga Melo et al. Non-clinical acute and chronic toxicity evaluations of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) hydroalcoholic leaf extract. Toxicology Reports, v. 5, p.890-896, 2018.
- DEPARTAMENTO DE HIPERTENSÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (Rio de Janeiro - Brasil). 7^a Diretriz Brasileira de Hipertensão. Revista Brasileira de Hipertensão, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p.12-16, 01 jan. 2017
- DRIES, Samuel Selbach et al. Oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin. Scientia Medica, Novo Hamburgo, v. 27, n. 2, p.2-8, 30 maio 2017.
- FARAJI, Bahram; KANG, Han K.; VALENTINE, Jane L. Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. Clinical Chemistry, California, v. 33, n. 4, p.539-543, 01 abr. 1987
- FULANETTI, Fernanda Bonet et al. "Toxic effects of the administration of *Mikania glomerata* Sprengel during the gestational period of hypertensive rats." Open veterinary journal vol. 6, p. 23-9, 2016.

IONITA, Radu et al. Ameliorative effects of *Matricaria chamomilla* L. hydroalcoholic extract on scopolamine-induced memory impairment in rats: A behavioral and molecular study. *Phytomedicine, Romenia*, v. 47, p.113-120, ago. 2018.

KANG, Ji-eun et al. Dietary Supplementation With a *Bacillus* Superoxide Dismutase Protects Against γ -Radiation-induced Oxidative Stress and Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-induced Ulcerative Colitis in Mice. *Journal Of Crohn's And Colitis*, v. 12, n. 7, p.860-869, 14 mar. 2018.

KOLODZIEJCZYK-CZEPAS, Joanna et al. Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic–polysaccharide conjugates. *International Journal Of Biological Macromolecules, Polonia*, v. 72, p.1152-1158, jan. 2015.

LIGUORI, Ilaria et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions In Aging*, v. 13, p.757-772, abr. 2018.

LIU, Zai-qun. Antioxidants may not always be beneficial to health. *Nutrition*, v. 30, n. 2, p.131-133, fev. 2014.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. *Revista Brasileira de Epidemiologia, Sao Paulo*, v. 22, p.22-35, 1 abr. 2019.

MANCINI, Antonio et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators Of Inflammation, Italia*, v. 23, p.1-12, 2016.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967

PLEBAN PA, MUNYANI A, BEACHUM J. Determination of Selenium Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in Plasma and Erythrocytes. *Clin Chem*. 1982;28: 311-316.

SAAD, Anouar Ben et al. *Malva sylvestris* extract protects upon lithium carbonate-induced kidney damages in male rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy, Tunisia*, v. 84, p.1099-1107, dez. 2016.

SINGH, S. et al. Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Scandinavian Journal Of Immunology, India*, v. 85, n. 2, p.130-137, fev. 2017.

TAENE, Abdolghader et al. The Association of Major Depressive Disorder with Activation of NLRP3 Inflammasome, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Capacity. *Journal Of Molecular Neuroscience, Irã*, p.15-22, 12 set. 2019.

WHO. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2018.

YARIBEYGI, Habib et al. Oxidative stress induces renal failure: A review of possible molecular pathways. *Journal Of Cellular Biochemistry*, v. 119, n. 4, p.2990-2998, 2 jan. 2018.

ZHANG, Yu-jie et al. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules*,v. 20, n. 12, p.21138-21156, 27 nov. 2015.

5 CAPÍTULO 2

CYTOTOXICITY OF *Achyrocline satureoides*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla* and *Mentha pulegium* INFUSIONS IN 3T3 CELL LINE

Tainara Vargas de Oliveira^{1,2}, Natasha da Rosa Silva¹, Amanda Schu Ponath^{1,2}, Alana Witt Hansen⁴ Edna Sayuri Suyenaga⁵, Magda Susana Perassolo⁵ e Ana Luiza Ziulkoski⁵.

¹Graduated in pharmacy at Feevale university.

²Master's student in Toxicology and Toxicological Analysis at Feevale University.

³Master in Toxicology and Toxicological Analysis at Feevale University.

⁴ PhD in Pharmacology and Therapeutics at Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵Professor of the Academic Master's Degree in Toxicology and Toxicological Analysis at Feevale University.

Corresponding author:

Ana Luiza Ziulkoski

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale

2755, ERS-239, – Vila Nova district

Zip code 93525-075, Novo Hamburgo – RS, Brazil

E-mail: analuiza@feevale.br

ABSTRAT

Medicinal plants (MPs) have always been used by humans, however, most of the popular MPs do not have a well-known toxic profile. Thus, this work aimed to evaluate the toxicity of several concentrations of the following MPs infusion: *Achyrocline satureoides* (As), *Cymbopogon citratus* (Cc), *Matricaria chamomilla* (Mc) and *Mentha pulegium* (Mp), separately, in 3T3 cell line. Infusions were prepared as prescribed by the brazilian therapeutic form and each infusion was used as the diluent for a cell culture medium. Cells were exposed to the infusions for 24 h (acute) or 72 h (chronic) periods. Cytotoxicity was estimated by MTT (mitochondrial activity) and sulforhodamine B (protein content) colorimetric assays. The antioxidant potential *in vitro* of the infusions was also investigated using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method. After acute expositions, the results demonstrate toxicity at a concentration of 20 mg/mL (50%) for the Cc infusion, from 2 mg/mL (70%) for the Mc infusion and 0.67 mg/mL (75%) for Mp infusion, while As did not cause cytotoxicity. After chronic exposition, loss of cell function was detected from the concentration of 5 mg/mL (50%) for As, 5 mg/mL (50%) for Cc, 3.2 mg/mL (80%) for Mc and 0.067 mg/ml (70%) for Mp. Mc infusion demonstrated the highest antioxidant potential, followed by Mp, As and Cc. Mp infusion was the most cytotoxic, causing cell damage from the lowest concentrations after the chronic exposition. The toxicity of all PMs analyzed increased in a dose-dependent way, suggesting that their chronic use may be associated with cell damage.

Key-words: Chamomile, Lemongrass, Cell culture, Marcela, Pennyroyal.

INTRODUCTION

Medicinal plants (MPs) have always been used by humans. Since ancient times, there are reports on its use, because of the molecules in its composition with therapeutic potential (ATANASOV et al., 2015). This practice is recognized by national entities, like the Ministry of Health, and international ones like the World Health Organization - WHO (ZENI et al., 2017).

Currently, it is estimated that about 80% of the world population uses plants or their preparations. In Brazil, the regulation of the use of MPs and Phytotherapy started in 2006, after the approval of the National Policy of Integrative and Complementary Practices in SUS (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPICS)) (BRASIL, 2015).

On the other hand, one of the most concerned points is that many people believe that MPs are natural, and therefore not harmful to human health (ZENI et al., 2017), which are not always true. Most phytotherapeutics and MPs used by the general population do not have well known toxicological and pharmacodynamic profiles (CAMPOS et al., 2016).

In this context, *in vitro* toxicity assays have several advantages, as their techniques use a little amount of sample, a high number of repetitions can be done, and the obtained results are easily interpreted. *In vitro* methods are useful to elucidate the toxicity mechanisms of a test substance (ERHIRHIE; IHEKWEREME; ILODIGWE, 2017).

MPs are mostly consumed by the general population as teas (infusions). Thus, studies that contemplate vegetable products as they are commonly used are important to determine their effectiveness and safety (COLPO et al., 2016; SALGUEIRO et al., 2016; BIANCHINI et al., 2017).

In this context, the present study is practical and experimental research about the four most commonly plant species used in adjuvant treatment by chronic patients of an integrated center of health specialties of the Rio Grande do Sul institution (CAMPOS et al., 2018; MINETO et al., 2018), namely: *Achyrocline satureoides* (Marcela), *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Matricaria chamomilla* (chamomile) and *Mentha pulegium* (pennyroyal).

Therefore, this work aimed to evaluate the cytotoxicity of different concentrations of each of these plant infusions in the 3T3 cell line after acute and chronic exposure, through dose-response curves.

METHODOLOGY

PLANT MATERIAL COLLECTION

Samples of *A. satureioides* (flowering sums), *C. citratus* and *M. pulegium* (leaves) were collected during the flowering period (March 2019). The flowers of *M. chamomilla* were collected in September of 2019. The plant species were collected in the cities of Novo Hamburgo (coordinates: latitude -29.67820981, longitude -51.11335516) and Igrejinha (coordinates: latitude -29.58838577, longitude -50.80807686), respectively, in the state of Rio Grande do Sul, located in southern Brazil.

Subsequently, all samples were identified botanically, from the exsiccates. *C. citratus*, *A. satureioides*, *M. chamomilla*, and *M. pulegium* exsiccates are available in the academic collection of the Feevale University botany laboratory under the following identification: HEFE 451, HEFE 457, HEFE 458 and HEFE 459, respectively. The names of the plants were verified in "The Plant List" (www.theplantlist.org) (accessed on January 16, 2020).

These plants were dried in a cool, aired place, at room temperature (25 ° C), protected from sunlight, to replicate the traditional method of preparation of these species. After the stabilization of these plant materials, they were properly stored in clean glass bottles until the moment of use.

INFUSIONS PREPARATION

First, the plant material was weighed in the following concentrations: *A. satureioides* 1.5 g (10 mg/mL); *C. citratus* 3 g (20 mg/ml); *M. chamomilla* 3 g (20 mg/mL) and *M. pulegium* 1 g (6.7 mg/mL) (BRASIL, 2011). Then, 150 mL of ultrapure water (MilliQ®) at 80 ° C was added, followed by 10-minute muffling, according to the Brazilian Pharmacopoeia Formulation Form (Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2011). The infusions were filtered by a qualitative paper filter to remove the plant material, obtaining a clear infusion.

PHYTOCHEMICAL SCREENING

Phytochemical characterization of the secondary metabolites of the infusion was performed as described by Costa (1990), using colorimetric and qualitative assays. It was investigated the presence of phenolic compounds, flavonoids, coumarins, tannins, anthraquinones, saponins and alkaloids.

Mayer, Dragendorff and Bertrand reagents were used to characterize alkaloids. The extract was divided into three parts and three drops of each reagent were added in a different fraction. Then, it was observed if was produced any precipitate. Phenolic compounds were investigated by the reduction oxide method, in which a drop of ferric chloride is added in the infusion, and the color obtained by the reaction determines its presence or absence. Coumarins were identified in UV light at 360 nm, and at 245 nm in an alkaline medium.

To identify the presence of flavonoids it was used concentrated hydrochloric acid and powdered magnesium. If positive, it was produced a red, pink or brown color. The detection of quinones was performed according to the Borntraeger method, which is based on the solubility of these compounds. Saponins were identified by vigorously shaken of the aqueous extract followed by the addition of 2% HCl. The formation of foam indicates the presence of saponins. Tannins were identified by the protein precipitation method by adding a 1 % gelatin solution over the aqueous extract dropwise.

INFUSUS ANTIOXIDANT TOTAL POTENTIAL

The antioxidant total potential of each infusion was determined using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method, described by Benzie and Strain (1996). In this analysis, infusions were at the maximum concentration (100%). All tests were performed in triplicate.

To determine the total antioxidant potential, samples of *A. satureioides*, *C. citratus*, *M. chamomilla*, and *M. pulegium* infusions, were separately put in contact with the FRAP. Thus, the antioxidant potential was determined using the spectrophotometric method, based on the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺, FRAP values were determined by plotting on a standard curve produced by adding ferrous sulfate to the FRAP reagent.

CELL CULTURE

The cell line used is representative of fibroblasts from mouse embryonic tissue NIH-3T3, originating from the Banco de Células do Rio de Janeiro - Brazil.

Cells were maintained in a humid incubator at 5% CO₂ at 37 ° C (usual conditions). Cells were grown in 75 cm² bottles in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma®) with 4.5 g/L of glucose, and supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB, Cultilab®). Trypsinization of cell culture was performed at least twice a week. The culture medium was changed whenever necessary.

PREPARATION OF THE EXPOSITIONS MEDIUMS

Our study group used a medium preparation method with the infusion itself, therefore the infusions were filtered with a qualitative filter paper to obtain a clear infusion, and then used as the solvent for the preparation of the DMEM medium. The pH of the medium with the infusion was adjusted (7.4), to maintain the ideal conditions for cell culture (TRINTINAGLIA et al., 2015).

The prepared medium was sterilized by 0.22 µm membrane filtration. Previous experiments were performed to determine the final concentrations of this study. In this way, the culture medium was obtained with 100% of the infusion, and sequential dilutions were performed using regular culture medium, to obtain the 75, 50, 25, 10 and 1 % concentrations, for infusions containing *A. satureioides* and *C. citratus*, which corresponds to 7.5, 5, 2.5, 1, and 0.1 mg/mL and 15, 10, 5, 2 and 0.2 mg/mL, respectively.

The *M. chamomilla* and *M. pulegium* infusions concentrations used were 100, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 2.5 and 1%, corresponding to 20, 10, 5, 4, 3.2, 2, 1, 0.5 and 0.2 mg/mL and 6.67, 3.34, 1.67, 1.34, 1, 0.67, 0.34, 0.17, 0.067 mg/mL, respectively. The mediums were supplemented with 1% fetal bovine serum (SFB, Sigma®).

CYTOTOXICITY ASSAYS

For cytotoxicity assays, semi confluent cultures were seeded in 96-well microplates and maintained in the usual condition. After 24 hours of seeding, the regular medium was removed and the cells were exposed to the medium with infusion, at all tested concentrations, in quadruplicates. The acute assay was performed after 24 hours of exposition, and the chronic assay after 72 hours of exposition. During the

chronic exposition, the culture media was renewed every 24 hours. Cells maintained in regular DMEM medium (BFS 1%) was used as the negative control, and the positive control was produced by adding 2% hydrogen peroxide in DMEM medium an hour before performing the assays. Three independent experiments were performed in all studied conditions.

At the end of each exposition period, mitochondrial activity was assessed by the MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay, as described by Mosmann (1983). Sulforhodamine B (SRB) assay, which correlates protein content with cell viability, was also performed as described by Skehan (1990).

Mediums with infusion were removed before the cytotoxicity assays, and the cells were washed with saline solution, to avoid potential interferences.

STATISTICAL ANALYSIS

All results were analyzed using the SPSS® 25.0 statistical software. The FRAP examinations, to verify the total antioxidant activity, were performed in triplicate and the results are expressed by mean ± standard deviation.

Regarding the cytotoxicity assays, the results were expressed as % of the negative control and represent the profile obtained in three independent tests. The results were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Tukey post-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Results of the phytochemical screening of infusions are described in Table 1. Phenolic compounds, flavonoids, and coumarins were characterized in the sample of *A. satureioides*. Regarding *C. citratus*, the presence of phenolic compounds, flavonoids, tannins, and alkaloids was observed. In *M. chamomilla* samples, phenolic compounds, flavonoids, and coumarins were characterized. Results of *M. pulegium* were positive for phenolic compounds, flavonoids, tannins, saponins, and alkaloids.

Results of the *in vitro* antioxidant action of the infusions are shown in Table 2. The higher total antioxidant potential was observed for *M. chamomilla*, followed by *M. pulegium*, *A. satureioides*, and *C. citratus*.

Table 1. Qualitative analysis of secondary metabolites in the aqueous extracts of *A. satureioides* (1.5 g/150 mL), *C. citratus* (3 g/150 mL), *M. chamomilla* (3 g/150 mL) and *M. pulegium* (1 g/150 mL).

PARAMETERS	PLANTS			
	<i>A. satureioides</i>	<i>C. citratus</i>	<i>M. chamomilla</i>	<i>M. pulegium</i>
Phenolic Compounds	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+
Coumarins	+	-	+	-
Tannins	-	+	-	+
Anthraquinones	-	-	-	-
Saponins	-	-	-	+
Alkaloids	-	+	-	+

Source: Elaborated by the author. (+) present; (-) absent.

Table 2. Total antioxidant potential *in vitro* of *A. satureioides* (1.5 g/150 mL), *C. citratus* (3 g/150 mL), *M. chamomilla* (3 g/150 mL) and *M. pulegium* (1 g/150 mL) infusions by FRAP method.

MEDICINAL PLANTS	FRAP (μ M)	p
<i>Achyrocline satureioides</i>	692 \pm 23	
<i>Cymbopogon citratus</i>	82 \pm 20	
<i>Matricaria chamomilla</i>	2142 \pm 96	<0.001
<i>Mentha pulegium</i>	1677 \pm 192	

Source: Elaborated by the author. Linearity factor of $R^2 = 0.9973$.

Higher values indicate higher antioxidant power

Based on the results obtained by the cytotoxicity assays for the *A. satureioides* infusion (Figure 1 - A.1), no toxic effect was observed after 24 hours in both tests. However, after the chronic exposition (Figure 1 - A.2), cells increased by about 50%

mitochondrial activity with 0.1 mg/mL, followed by a slight increase in protein content. From the concentration of 5 mg/mL, there was a significant decrease (about 50%) in cell viability. The toxicity observed increased in a dose-dependent way in 7.5 and 10 mg/mL concentrations, reaching 80% in the highest concentration of *A. satureioides* tested.

C. citratus infusion caused cytotoxicity only at a concentration of 20 mg/mL after the acute exposition for both tests (Figure 2 - B.1), resulting in a 50% decrease in mitochondrial activity and 35% in protein content. In chronic exposure (Figure 2 - B.2), higher MTT values (47%) are observed at the concentration of 0.2 mg/mL, suggesting mitochondrial dysfunction. Concerning the protein content, from the concentration of 2 mg/mL, it was observed a reduction directly related to the infusion concentration. The decrease in cell viability was from 35% (2 mg/mL) to 75% (20 mg/mL).

After acute exposition to *M. chamomilla* infusion (Figure 3 - C.1), cells increased mitochondrial activity at concentrations of 0.2 mg/mL (35%), 1 and 2 mg/mL (20%), while from the concentration of 3 mg/mL decreased the mitochondrial activity, reaching a 60% reduction in the concentration of 4 mg/mL and complete loss of function with 10 and 20 mg/mL. Finally, a 40% reduction in protein content was observed from the concentration of 5 mg/mL, and no viability in the two highest concentrations. After chronic exposition (Figure 3 - C.2), in the lowest concentration (0.2 mg/mL) cells showed a 50% decrease in protein content and 40% in mitochondrial activity, with 100% loss of cell viability in the highest two concentrations tested (10 and 20 mg/mL), in both assays.

Acute exposition to the *M. pulegium* infusion (Figure 4 - D.1), reduced 40% mitochondrial activity at the concentration of 1.34 mg/mL. The 1.67 and 3.34 mg/mL concentrations reached 80% reduction of mitochondrial activity, and a complete loss of function occurred with 6.67 mg/mL concentration. In the evaluation of protein content, it was possible to observe toxicity higher than 70% only from 1.67 mg/mL, reaching 100% of cell death in 6.67 mg/mL. Finally, after chronic exposition to *M. pulegium* infusion (Figure 4 - D.2), it was observed a decrease in mitochondrial activity and protein content, from the lowest concentration (0.067 mg/mL), reaching more than 75% of toxicity with 1 mg/mL.

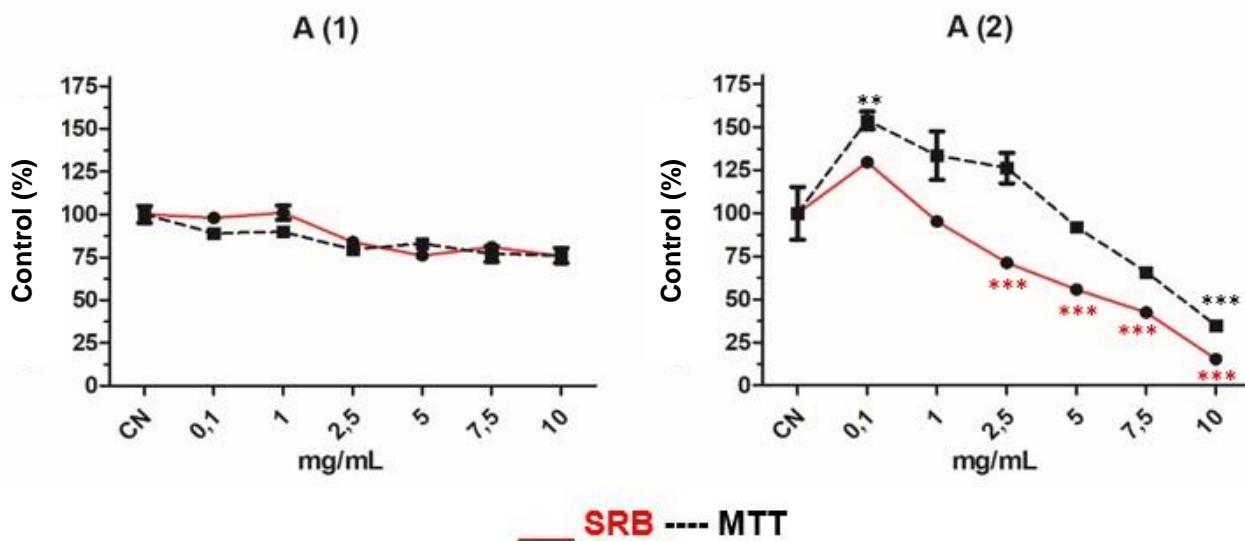


Figure 1. Cytotoxicity profile of *A. satureioides* (A) infusion in NIH-3T3 cell line. (1) acute exposition (24 hours) and (2) chronic exposition (72 hours). Results expressed in % of the negative control (NC), defined as 100%. Cytotoxicity was determined using the SRB adsorption (protein content) and the MTT reduction (mitochondrial functionality) assays. Differences from the NC are represented by * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.001$ and *** when $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Tuckey post hoc).

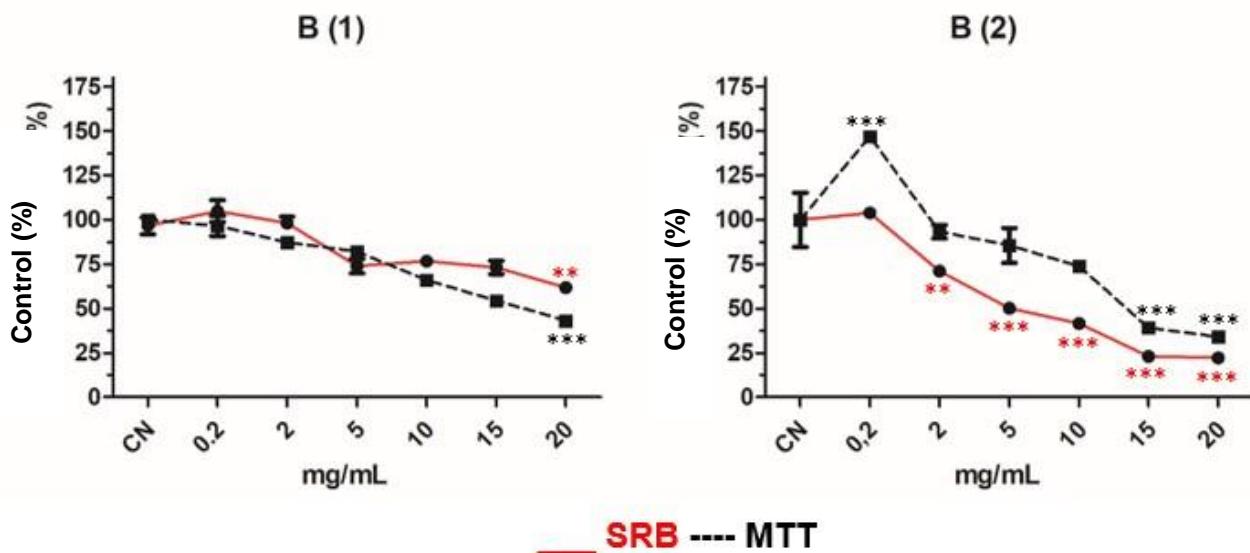


Figure 2. Cytotoxicity profile of *C. citratus* (B) infusion in NIH-3T3 cell line. (1) acute exposition (24 hours) and (2) chronic exposition (72 hours). Results expressed in % of the negative control (NC), defined as 100%. Cytotoxicity was determined using the SRB adsorption (protein content) and the MTT reduction (mitochondrial functionality) assays. Differences from the NC are represented by * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.001$ and *** when $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Tuckey post hoc).

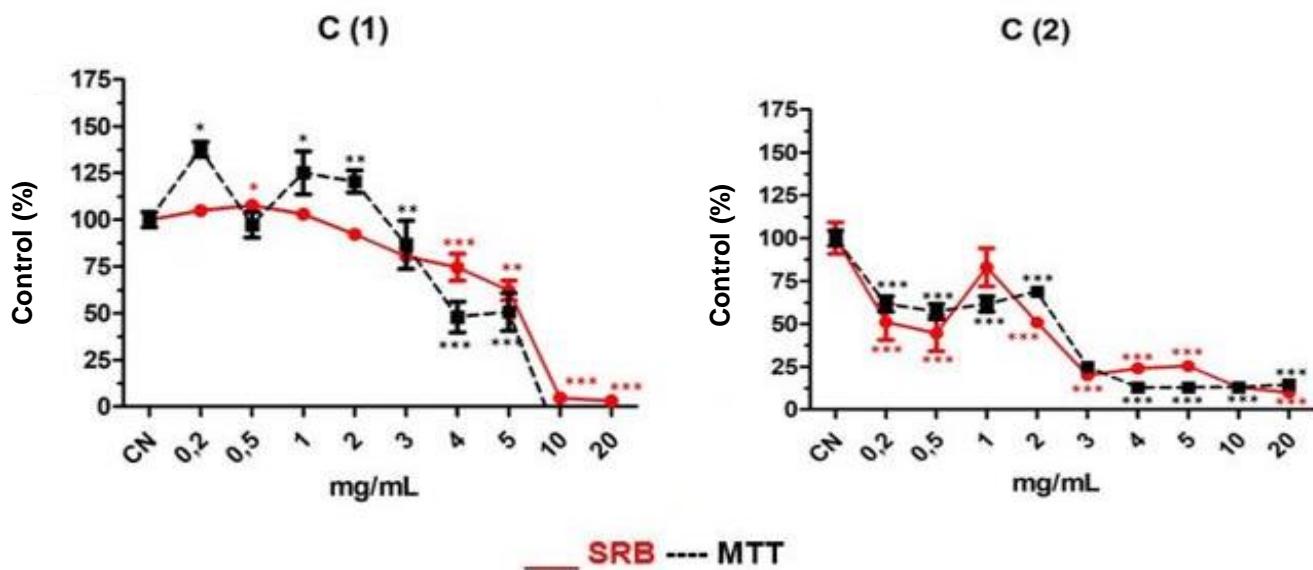


Figure 3. Cytotoxicity profile of *M. chamomilla* (C) infusion in NIH-3T3 cell line. (1) acute exposition (24 hours) and (2) chronic exposition (72 hours). Results expressed in % of the negative control (NC), defined as 100%. Cytotoxicity was determined using the SRB adsorption (protein content) and the MTT reduction (mitochondrial functionality) assays. Differences from the NC are represented by * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.001$ and *** when $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc).

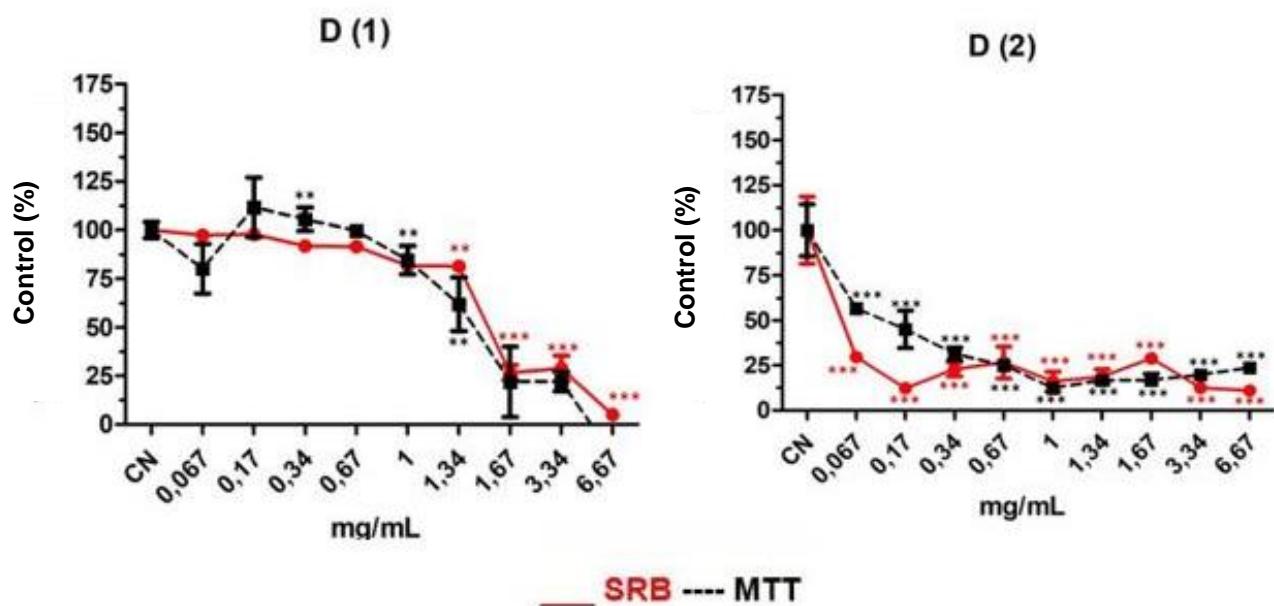


Figure 4. Cytotoxicity profile of *M. pulegium* (D) infusion in NIH-3T3 cell line. (1) acute exposition (24 hours) and (2) chronic exposition (72 hours). Results expressed in % of the negative control (NC), defined as 100%. Cytotoxicity was determined using the SRB adsorption (protein content) and the MTT reduction (mitochondrial functionality) assays. Differences from the NC are represented by * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.001$ and *** when $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc).

Regarding the morphological changes induced by the infusions, the main changes are described in Tables 3, 4, 5 and 6, according to the concentrations and the exposition period.

Table 3. Main morphological changes in 3T3 cell line after acute (24h) and chronic (72h) exposition to the *Achyrocline satureioides* infusion

<i>Achyrocline satureioides</i>		
Concentration (mg/mL)	24 h	72 h
0.1	Typical morphology	Typical morphology
1		Retraction
2.5	Typical morphology and mild granularity	Increased granularity
5		
7.5	Moderate granularity	Increased granularity, retraction, and detachment of cells
10	Granularity and retraction, detachment of cells	Strong retraction, rounding and detachment of cells

Source: Elaborated by the author.

Typical morphology of 3T3 cells, elongated and thin fibroblasts.

Table 4. Main morphological changes in 3T3 cell line after acute (24h) and chronic (72h) exposition to the *Cymbopogon citratus* infusion

<i>Cymbopogon citratus</i>		
Concentration (mg/mL)	24h	72h
0.2	Typical morphology	Retraction
2		Vacuolization and lower cell density
5	Typical morphology and mild vacuole	Vacuolization and retraction
10	Vacuolization and lower cell density	Vacuolization and retraction
15		Increased granularity and vacuolization
20	Vacuolization, retraction and detachment	Rounding

Source: Elaborated by the author.

Typical morphology of 3T3 cells, elongated and thin fibroblasts.

Table 5. Main morphological changes in 3T3 cell line after acute (24h) and chronic (72h) exposition to the *Matricaria chamomilla* infusion.

<i>Matricaria chamomilla</i>		
Concentration (mg/mL)	24h	72h
0.2		
0.5	Typical morphology	Rounding and retraction
1		
2	Typical morphology and few granules	Increased granularity and retraction
3	Increased granularity	
4	Cell retraction	
5	Vacuolization, retraction and fragmentation	Vacuolization, retraction and fragmentation
10	Increased granularity and retraction	
20		Rounding and fragmentation

Source: Elaborated by the author.
 Typical morphology of 3T3 cells, elongated and thin fibroblasts.

Table 6. Main morphological changes in 3T3 cell line after acute (24h) and chronic (72h) exposition to the *Mentha pulegium* infusion.

<i>Mentha pulegium</i>		
Concentration (mg/mL)	24h	72h
0.067	Typical morphology	
0.17		
0.34		Cell retraction, rounding and detachment
0.67	Increased granularity	
1		
1.34		
1.67		Cell retraction, rounding, detachment and fragmentation
3.34	Cell retraction, rounding and detachment	
6.67		

Source: Elaborated by the author.
 Typical morphology of 3T3 cells, elongated and thin fibroblasts.

DISCUSSION

The response profile showed by the cells was dependent on concentration for each of the studied infusions, with an increase in toxicity at the highest concentrations. It is known that 3T3 cells are very sensible, and because of that, it is indicated for tests that determine initial oral doses of toxic substances (MORETTO; STEPHANO, 2019).

Results of the FRAP analysis suggest that the *A. satureioides*, *C. citratus*, *M. chamomilla*, and *M. pulegium* infusions have antioxidant potential *in vitro*. *M. chamomilla* aqueous extract showed the highest total antioxidant potential, followed by *M. pulegium*, *A. satureioides*, and *C. citratus*. The results found seem to be related to the content of phenolic compounds and flavonoids, secondary metabolites with potential antioxidant. These compounds are known for their antioxidant activities, which may justify the result found in the FRAP assay (SALGUEIRO et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Phytochemical screening of flowering sums of *A. satureioides* showed the higher levels of the flavonoids and phenolic compounds, corroborating with the findings of other studies (SABINI et al., 2013; CARIDDI et al., 2015; SALGUEIRO et al., 2016). Furthermore, the results of the cytotoxicity assays indicated little toxicity during the acute exposition period, a profile similar to that described by Sabini and collaborators (2013). They evaluated the cytotoxicity of the *A. satureioides* aqueous extract in the Vero cell line in a 24-hour exposition also showing low toxicity (SABINI et al., 2013).

On the other hand, chronic exposition to the *A. satureioides* infusion showed a proliferative effect at the lowest concentration tested (0.1 mg/mL), identified by the increase in mitochondrial activity and protein content. Alerico and his collaborators (2015) reported that aqueous and ethanolic extract of *A. satureioides* promoted cell proliferation in the HaCat cell line (human keratinocytes), identified by MTT assay, showing a significant proliferation since the lowest concentration tested (ALERICO et al., 2015).

However, our results also showed that concentrations of *A. satureioides* infusion above 5 mg/mL induced cytotoxicity in the analyzed cells. Other studies report similar results at high concentrations, suggesting that the combination of flavonoids in *A. satureioides*, some exclusive to this plant, presents synergistic activity potentiating the

cytotoxic effect. This result is in agreement with the results obtained by the present study (SABINI et al., 2013; CARIDDI et al., 2015; SOUZA et al., 2018).

Variations of the phytochemical profile of the *C. citratus* leaves, as well as for other plant species, may occur depending on the geographic origin, extraction process, harvest time. Though, phenolic compounds, flavonoids, tannins, and alkaloids are always part of the composition. In the present study, these compounds were identified as well as reported by RORIZ et al., 2015; Méabed et al., 2018 and Thorat et al., 2018.

The cytotoxic effects of *C. citratus* were more evident after the chronic exposition, wherein the lowest concentration (0.2 mg/mL) higher MTT values were observed. This suggests a mitochondrial dysfunction since the following concentrations showed toxicity. It is known that phenolic compounds can directly regulate the mitochondrial apoptosis system, both in preventing and promoting this process. Polyphenols also modulate mitochondrial biogenesis, dynamics and autophagic degradation, to maintain the quality and number of mitochondria (GIBELLINI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; NAOI et al., 2019).

Flavonoids are bioactive polyphenols most commonly found in plant species. Besides being often described as non-toxic compounds, some studies have shown that they can influence a variety of cell functions through the modulation of cell signaling. Furthermore, under certain conditions, flavonoids may show toxicity due to the production of free radical species (CARIDDI et al., 2015; NAOI et al., 2019).

Regarding *M. chamomilla* flowers, phenolic compounds, flavonoids, and coumarins were identified. Phytochemical screening of *M. chamomilla* aqueous extract, performed by Nayak, Raju, and Rao (2007) also showed the presence of phenolic compounds and flavonoids. Results obtained from the *M. chamomilla* infusion showed a higher antioxidant potential, when compared to the others studied infusions. However, this potential did not guarantee low toxicity for cells in both acute and chronic expositions. The high cytotoxicity showed in this study is possibly associated with the effects of the plant compounds, or with the antagonism, synergism or potentiation of the mixture of the compounds can promote (BIANCHINI et al., 2017). Thus, the *M. chamomilla* infusion caused changes in cell function and possibly an incapacity to repair and detox, especially after the chronic exposition (VILLELA et al., 2007).

Phytochemical screening of *M. pulegium* leaves identified the presence of phenolic compounds, flavonoids, tannins, saponins, and alkaloids, corroborating the

results observed by Zekri et al. (2012). *M. pulegium* infusion caused cytotoxicity, and induced cell death in the lowest concentrations. This is possibly associated with the formation of reactive species or to the oxidizable character of the compounds of the plant (tannins, saponins, alkaloids, and oils essentials) (TAMBORENA et al., 2015). Bianchini and colleagues (2017) hypothesized that the *M. pulegium* aqueous leaves extract could modulate oxidative changes, by their secondary metabolites, such as flavonoids. This could occur because of its ability to interact and penetrate lipid bilayers, increasing toxicity. In addition to this metabolite, saponins in the infusion are found in several plant species and have been described as a group of biomolecules with cytotoxic potential (DÍAZ et al., 2019; WANG et al., 2019).

In general, the results showed that the infusions of the studied plants affected mitochondrial activity inducing the cells to reduce their activity. Mitochondria are vital organelles for cells, because, besides synthesizing ATP molecules by oxidative processes, they also exchange metabolites, importing proteins, produce heat and induces apoptosis (SILVA; FERRARI, 2011). Based on the results, the toxic profile of the plants seems to start with the reduction of mitochondrial activity, and consequent cell death, evidenced by the reduction of protein content.

It is known that SRB binding is stoichiometric, and the amount of dye extracted from the cells is directly proportional to the cell mass (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Cell proliferation is a phenomenon of cell division, generating a new cell, and as a consequence, an increase in biomass occurs. The differences observed in protein content in acute and chronic expositions indicate a reduction with increasing infusion concentrations, and one can infer that there was no cell proliferation, but a relevant cell death.

The present study presents the cytotoxicity of infusions in cell monolayers, which does not allow to directly relate the toxic concentrations with living systems. In these complex systems, there are pharmacokinetic mechanisms, biotransformations and metabolism of the components of plants, and their secondary metabolites, as well as the interaction between organs. However, it is important to emphasize that the toxicological knowledge of MPs, mainly its extracts usually consumed by the population, is important to draft the toxicological profile of plants and the mechanisms of the cell involved with toxicity. Thus, these data help to elucidate the toxicological profile of plant species that are widely used by the population in Southern Brazil.

CONCLUSION

The cytotoxic effects caused by *A. satureioides* (marcela), *C. citratus* (lemongrass), *M. chamomilla* (chamomile) and *M. pulegium* (pennyroyal) infusions showed a profile of decreased 3T3 cell line viability by increasing concentration and exposition period. Based on these results, it is suggested that the prolonged use of these MPs may be associated with changes in cell function. This could especially occur to those tissues in higher contact with the plants, because of absorption and metabolism mechanisms (digestive epithelium, liver, and kidneys).

Comparing the 4 studied infusions, the *M. pulegium* infusion was the most cytotoxic, causing cell changes since the lowest concentrations after the chronic exposition, followed by the *M. chamomilla*, *C. citratus*, and *A. satureioides* infusions. The toxic effects observed are possibly related to the secondary metabolites of each plant.

Finally, further studies and *in vitro* experiments are needed to confirm the toxicity of these infusions, to verify the mechanism of toxicity, analyzing the formation of reactive species and the occurrence of apoptosis. To establish the safe use of these medicinal plant infusions, *in vivo* studies are also necessary to ensure their safety and effectiveness, among other actions that can contribute to the population's health.

Funding: Feevale, Capes. This work has financial support by PPSUS public notice 03/2017 (CNPq and FAPERGS).

REFERENCES

- ALERICO, Gabriela C. et al. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Journal Of Ethnopharmacology*, Porto Alegre, v. 176, p.305-310, dez. 2015.
- ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, Austria, v. 33, n. 8, p.1582-1614, dez. 2015.
- BENZIE, IFF, STRAIN JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Biochem*. 996;239(1):70-6. 1996.
- BIANCHINI, Matheus et al. *Mentha pulegium* crude extracts induce thiol oxidation and potentiate hemolysis when associated to t-butyl hydroperoxide in human's erythrocytes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, Uruguaiana*, v. 89, n. 4, p.2901-2909, 11 dez. 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- CAMPOS, César Augusto Miorelli et al. Evaluation of Pharmacodynamic Interactions between Medicinal Plants and Drugs in Patients with Chronic Diseases in South Brazil. *Lat Am J Pharm*. 37(8):1551-57, 2018.
- CAMPOS, S.C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Belo Horizonte, v. 18, n. 11, p.373-382, 2016.
- CARIDDI, L. N. et al. In Vitro and *In Vivo* Cytogenotoxic Effects of Hot Aqueous Extract of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. *Biomed Research International*, Argentina, v. 2015, p.1-12, 2015.
- COLPO, Ana Carolina et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chemistry*, Uruguaiana, v. 209, p.185-195, out. 2016.
- COSTA AF. Farmacognosia. 3. ed, Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian; 2000.
- DÍAZ, Andrea Estefanía Carpinteyro et al. Cytotoxic saponins and other natural products from flowering tops of *Narthecium ossifragum* L. *Phytochemistry*, Noruega, v. 164, p.67-77, ago. 2019.

ERHIRHIE, Ernest Oghenesuvwe; IHEKWEREME, Chibueze Peter; ILODIGWE, Emmanuel Emeka. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptanc. *Interdisciplinary Toxicology*, Nigeria, v. 11, n. 1, p.5-12, 13 dez. 2017.

GIBELLINI, Lara et al. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, Italia, v. 2015, p.1-13, 2015.

MÉABED, Eman M. H.; ABOU-SREEA, Alaa I. B.; ROBY, Mohamed H. H.. Chemical analysis and giardicidal effectiveness of the aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. *Parasitology Research*, v. 117, n. 6, p.1745-1755, 17 abr. 2018.

MINETO, D. R. et al. 'MEDICATION ADHERENCE AMONG USERS OF MEDICINAL PLANTS IN SOUTH BRAZIL'. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 37, p. 2229-2238, 2018.

MORETTO, Lauro Domingos; STEPHANO, Marco Antonio. *Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil*. São Paulo: Limay, 732 p. 2019.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAOI, Makoto et al. Mitochondria in Neuroprotection by Phytochemicals: Bioactive Polyphenols Modulate Mitochondrial Apoptosis System, Function and Structure. *International Journal Of Molecular Sciences*, Japão, v. 20, n. 10, p.2451-2497, 17 maio 2019.

NAYAK, BS; RAJU, SS; RAO, AVC. Wound Healing Activity of Matricaria recutita L. extract. *J Wound Care*. 2007;16(7):298-302.

OLIVEIRA, Marcos Roberto de et al. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects*, Mato Grosso, v. 1860, n. 4, p.727-745, abr. 2016.

RORIZ, Custódio Lobo et al. Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, Portugal, v. 185, p.16-24, out. 2015.

SABINI, M.c. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. *Food And Chemical Toxicology*, Argentina, v. 60, p.463-470, out. 2013.

SALGUEIRO, Andréia C.f. et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureoides*. *Journal Of Ethnopharmacology*, Uruguiana, v. 194, p.6-14, dez. 2016.

SILVA, Wallison Junio Martins da; FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol, Rio de Janeiro, v. 3, n. 14, p.441-451, 2011.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. Jnci Journal Of The National Cancer Institute, v. 82, n. 13, p.1107-1112, 4 jul. 1990.

SOUZA, Priscila Oliveira de et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureoides* in gliomas cell lines. Toxicology In Vitro, Porto Alegre, v. 51, p.23-33, set. 2018.

TAMBORENA, Tatiana et al. Antioxidant Activity of some Medicinal Plant Extracts: Implications for Neuroprotection. Pharmacologia, Uruguiana, v. 7, n. 6, p.282-292, dez. 2015.

THORAT PP, et al. Effect of drying on phytochemical composition of lemongrass *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf powder. Ann Phytomed. (2):183-8; 2018.

TRINTINAGLIA, L et al. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. Brazilian Journal Of Biology, Novo Hamburgo, v. 75, n. 2, p.75-80, maio 2015.

VICHLI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols, Thailand, v.1, n. 3, p.1112-1116, ago. 2006.

VILLELA, Izabel Vianna et al. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis, v. 628, n. 2, p.76-86, abr. 2007.

WANG, Wenping et al. Hepatocellular Toxicity of Paris Saponins I, II, VI and VII on Two Kinds of Hepatocytes-HL-7702 and HepaRG Cells, and the Underlying Mechanisms. Cells, China, v. 8, n. 7, p.690-708, 9 jul. 2019.

ZEKRI N, Amalich S, et al. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. Med J Chem. 2(4):607-19; 2012.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. Ciência & Saúde Coletiva, Blumenau, v. 22, n. 8

6 CAPÍTULO 3

Avaliação de citocinas séricas envolvidas com resposta inflamatória em doentes crônicos usuários de plantas medicinais

Tainara Vargas de Oliveira^{1,2}, Alana Witt Hansen³, Ana Luiza Ziulkoski⁴ e Magda Susana Perassolo^{4,*}.

¹Graduada em Farmácia pela Universidade Feevale.

²Mestranda em Toxicologia e Análises Toxicológicas na Universidade Feevale.

³Doutora em Farmacologia e terapêutica pela UFRGS

⁴Docente da Universidade Feevale, atuando no Mestrado Acadêmico em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Autor para correspondência:

Magda Susana Perassolo

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale

ERS-239, n. 2755 – Bairro Vila Nova

CEP 93525-075, Novo Hamburgo – RS, Brasil

E-mail: magdaperassolo@feevale.br

RESULTADOS PARCIAIS

Dentre as metodologias propostas no estudo, está o ensaio referente às interleucinas, utilizando o kit BD™ CBA Human Th1/Th2/Th 17, por citometria de fluxo. Esta metodologia não tinha sido realizada ainda na instituição, desta forma, foi realizado o desenvolvimento do protocolo de uso do kit, e o manuseio do equipamento de citometria de fluxo juntamente com a utilização do software, localizado no Laboratório de Metodologias Avançadas em Biotecnologia, no Techpark/Campo Bom.

Até o momento foram dosados os níveis de citocinas de 49 pacientes do estudo, alcançando parcialmente este objetivo, em virtude da necessidade de manutenção do equipamento. Desta forma, serão apresentados resultados parciais desta análise.

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico exerce um papel importante em muitos processos que envolvem doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a ativação de citocinas inflamatórias. A inflamação é um mecanismo de proteção empregado contra抗ígenos endógenos e exógenos. As células do sistema imunológico, como as citocinas estão envolvidas diretamente no processo da inflamação crônica. Entre as citocinas algumas possuem características pró-inflamatórias como, por exemplo, IL1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF, IFN e IL-17, estas são necessárias para se iniciar e perpetuar a resposta inflamatória. Outras citocinas são anti-inflamatórias como, por exemplo, IL-4, IL-10 e IL-13 estas ajudam na resolução da inflamação e cicatrização da lesão (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009; PERNAMBUCO, 2014; PICKERING et al., 2018).

O desequilíbrio entre a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias pode ser o responsável pelo desencadeamento e manutenção dos sintomas de condições crônicas. Estudos relatam sobre o papel importante deste mecanismo no desenvolvimento de doenças como diabetes, dislipidemias e câncer, visto que, quando a inflamação se torna crônica, pode estar indicando uma condição patológica, caracterizada pela resposta contínua da inflamação e consequentemente gerando destruição tecidual (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009; PERNAMBUCO, 2014; PICKERING et al., 2018).

A planta medicinal (PMs) tem sido tradicionalmente utilizada no tratamento de patologias, é muito comum pacientes realizarem o uso de PMs junto ao tratamento medicamentoso. Algumas PMs apresentam atividade anti-inflamatória, essa ação está relacionada à presença de alguns compostos tais como polifenóis, flavonoides, terpenoides, alcaloides, antraquinonas, ligninas, polissacarídeos, saponinas e peptídeos. Dentre estes, os flavonoides estão entre os principais agentes anti-inflamatórios (MARMITT et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de citocinas pro e anti-inflamatórias em doentes crônicos usuários de PMs.

2. METODOLOGIA

2.1 COLETA DE DADOS

Foram selecionados voluntários atendidos um centro integrado de especialidades em saúde de uma instituição no sul do Brasil. A entrevista com cada paciente iniciou com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em duas vias, em seguida, responderam aos questionários de avaliação das características gerais dos pacientes, onde foram coletados dados clínicos dos voluntários. Neste mesmo questionário foi avaliado o perfil sociodemográfico dos mesmos e os aspectos relacionados ao uso de PMs (tipos de plantas e suas partes, frequência de uso, indicação e modo de preparo).

A amostra foi composta por 49 voluntários maiores de 18 anos portadores de uma ou mais DCNT, que utilizavam medicamentos de forma contínua e faziam o uso de PMs, com condições cognitivas para responder aos questionários. Foram excluídos pacientes que não atenderam esses critérios. O estudo foi dividido em dois grupos: grupo I, formado por doentes crônicos usuários de PMs e o grupo II, formado por doentes crônicos não usuários de PMs.

Após a entrevista, foram realizadas coletas de sangue venoso, as amostras de plasma foram separadas do sangue total mediante centrifugação. As alíquotas foram criopreservadas a -80º C até o momento das análises.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Feevale (CAAE 62834916.0.0000.5348) e foi conduzido de acordo com a resolução 466/2012, seguindo os preceitos da declaração de Helsinki.

2.2 ANALISE DE CITOCINAS

O perfil de citocinas foi analisado através da determinação de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF γ e TNF α em uma mesma amostra. A técnica utilizada para a quantificação de IL, foi através do kit BD™ CBA Human Th1/Th2/Th 17 (Cytometric Bead Array), utilizando beads recobertas com anticorpos monoclonais contra cada interleucina e detecção por citometria de fluxo.

Resumidamente, 50 μ l das amostras de plasma foram incubadas com sete diferentes esferas de captura de citocinas e com anticorpos de detecção de citocinas conjugados à ficoeritrina (PE) durante três horas, em temperatura ambiente e protegido da luz. Após esta etapa as amostras foram lavadas e ressuspensas em

tampão apropriado. A leitura foi realizada no equipamento de citometria de fluxo (BD Accuri C6 Plus), onde cada citocina pôde ser identificada pelo tamanho da esfera conectada a ela, bem como pela fluorescência emitida por seu anticorpo conjugado à PE.

Uma curva padrão foi estabelecida para cada uma das citocinas, os dez pontos da curva variaram de 0-5000 pg/ml. As concentrações em pg/ml de cada uma das citocinas foi determinada usando o Software FCAP Array v3. Análise estatística realizada através do teste t de *Student*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra foi composta por 49 voluntários, sendo 89,8% mulheres com idade média $59,2 \pm 9$ anos, não fumantes (90%). A DCNT que teve maior prevalência foi hipertensão arterial (55%), seguida de depressão (43%), hipotireoidismo (17%) e diabetes mellitus (11%). A maior parte dos pacientes no estudo possuía mais de uma patologia.

Conforme as citações dos pacientes a espécie com maior prevalência de uso foi capim-cidró (*C. citratus*), seguida de camomila (*M. chamomilla*), poejo (*M. pulegium*) e marcela (*A. satureioide*). As concentrações de interleucina 4 (IL-4, uma citocina anti-inflamatória) foram maiores em pacientes diabéticos usuários de canela de velho (*M. albicans*) e Insulina (*C. sicyoides*). O TNF (citocina pró-inflamatória) apresentou níveis aumentados em usuários de Insulina (*C. sicyoides*), em relação aos não usuários desta planta. Os valores estão descritos na Tabela 1.

As plantas em questão conforme estudos, têm atividade anti-inflamatórias envolvendo diferentes mecanismos de ação (SALGADO; MANSI; GAGLIARDI, 2009; PIERONI et al., 2011; BESERRA et al., 2016). Na medicina popular *C. sicyoides* é conhecida popularmente como “insulina vegetal”, *M. albicans* conhecida como “canela de velho”, ambas utilizadas para tratar diabetes, inflamação e artrite reumatoide (BESERRA et al., 2016; LIMA et al., 2018).

Tabela 1: Resultados parciais de 49 pacientes, analise de interleucinas.

	Insulina (<i>C. sicyoides</i>)			Canela de velho (<i>M. albicans</i>)		
	Sim	Não	p value	Sim	Não	p value
IL-4	555,4	7,9	0,015	801,8	8,3	0,04
pg/mL	(39 – 801)	(1,6 – 56)		(801- 802)	(1,6 -79)	
TNF	292	8,6	0,04	-	-	-
pg/mL	(260 – 332)	(0 – 158)				

Fonte: Elaborado pelo autor. IL-4 – interleucina; TNF – Fator de necrose tumoral. *Nível de significância estatística p<0,05; Teste *U-Mann Whitney*; Dados expressos em mediana, percentil 25 e 75.

Dentre as principais DCNT a diabetes mellitus tipo 2 está em destaque, a inflamação crônica é uma das formas de apresentação do diabetes, que fornece uma ligação entre atherosclerose e diabetes devido à disfunção do sistema imunológico (BADR et al., 2018). A variação e expressão dos genes das citocinas são fatores que têm um papel nesse distúrbio metabólico. O desenvolvimento de diabetes e complicações diabéticas pode atribuir à expressão gênica de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias (BANERJEE; SAXENA, 2014; BADR et al., 2018).

A IL-4 tem capacidade para alterar a sensibilidade à insulina e a resposta imune local. Também pode atuar como um fator anti-lipogênico, melhorando a lipólise e inibindo a diferenciação de adipócitos (HO et al., 2010). O estudo realizado por Binisor e Moldovan (2016) apoiam a hipótese de que o aumento dos níveis séricos de IL4 no diabetes mellitus tipo 2 pode ser resultado de um aumento adaptativo da IL4 em um cenário de "resistência à IL4", visto que a IL - 4 foi mais elevada em pacientes diabéticos e obesos (BINISOR; MOLDOVAN, 2016).

Avaliações sobre os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos com *C. sicyoides*, tem chamado a atenção justamente em virtude da ação anti-inflamatória (SALGADO; MANSI; GAGLIARDI, 2009; PIERONI et al., 2011). Beserra e seus colaboradores (2016) analisaram extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *C. sicyoides*, os resultados demonstraram que o mecanismo de ação envolvido com o efeito anti-inflamatório do *C. sicyoides* está relacionado por meio da via da ciclooxigenase (COX) com base na diminuição observada dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂).

4. CONCLUSÃO

Com base nos dados iniciais, observou-se um aumento de IL-4 nos portadores de diabetes, porém não podemos afirmar que este aumento seja em função da PMs utilizada, visto que, estudos apontam um aumento desta citocina está associada a patologia do diabetes mellitus tipo 2. Entretanto, não podemos descartar a hipótese relacionada ao uso de *C. sicyoides*, visto que, tem sua ação anti-inflamatória afirmada na literatura. Assim, o estudo final em relação do perfil de citocinas, em doentes crônicos usuários de PMs, será finalizando posteriormente.

Apoio financeiro: Feevale, Capes. Este trabalho tem apoio financeiro do PPSUS edital 03/2017 (CNPq e FAPERGS).

5. REFERÊNCIAS

BADR, Eman et al. A preliminary study of the relation between IL-4 and hypertension in type II diabetes mellitus. *Molecular Biology Reports*, Egito, v. 45, n. 6, p.1967-1972, 4 set. 2018.

BANERJEE, Monisha; SAXENA, Madhukar. Genetic polymorphisms of cytokine genes in type 2 diabetes mellitus. *World Journal Of Diabetes*, India, v. 5, n. 4, p.493-504, 2014.

BESERRA, Fernando et al. *Cissus sicyoides*: Pharmacological Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory and Antidiarrheal Activities. *International Journal Of Molecular Sciences*, São Paulo, v. 17, n. 2, p.149-164, 23 jan. 2016.

BINISOR, Ioana Daniela; MOLDOVAN, Raluca. Abdominal Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus are Associated With Higher Seric Levels of IL 4 in Adults. *Current Health Sciences Journal*, Romenia, n. 3, p.231-237, 30 set. 2016.

DINIZ, Margareth de Fátima Formiga Melo et al. Non-clinical acute and chronic toxicity evaluations of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) hydroalcoholic leaf extract. *Toxicology Reports*, Paraiba, v. 5, p.890-896, 2018.

HO, Kuo-ting et al. Association of interleukin-4 promoter polymorphisms in Taiwanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism, Taiwan*, v. 59, n. 12, p.1717-1722, dez. 2010.

KHANSARI, Nemat; SHAKIBA, Yadollah; MAHMOUDI, Mahdi. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of AgeRelated Diseases and Cancer. Recent Patents On Inflammation & Allergy Drug Discovery, Tehran, Iran, n. 3, p.73-80, 12 set. 2009.

LIMA, Rita de Cássia Lemos et al. High-Resolution PTP1B Inhibition Profiling Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of PTP1B Inhibitors from *Miconia albicans*. Molecules, Goiania, v. 23, n. 7, p.1755-1768, 17 jul. 2018.

MARMITT, Dioge J. et al. Plantas Medicinais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. Revista Fitoterá, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p.129-144, 2015.

PERNAMBUKO, Andrei Pereira. IMPACTO DE UM PROGRAMA DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE SOBRE ASPECTOS NEUROIMUNOCOMPORTAMENTAIS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE FIBROMIALGIA. 2014. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Mg, 2014.

PICKERING, Raelene J et al. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications. Clinical & Translational Immunology, Australia, v. 7, n. 4, p.1016-1036, 2018.

PIERONI, Laís Goyos et al. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. Molecules, São Paulo, v. 16, n. 11, p.9439-9450, 10 nov. 2011.

SALGADO, Jocelem Mastrodi; MANSI, Débora Niero; GAGLIARDI, Antonio. *Cissus sicyoides*: Analysis of Glycemic Control in Diabetic Rats Through Biomarkers. Journal Of Medicinal Food, São Paulo, v. 12, n. 4, p.722-727, ago. 2009.

SERPELONI, Juliana Mara et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. Experimental And Toxicologic Pathology, Paraná, v. 63, n. 5, p.499-504, jul. 2011.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados obtidos neste estudo, podemos confirmar que grande parte dos doentes crônicos utilizam algum tipo de PMs junto ao seu tratamento. A utilização de *M. chamomilla*, melhorou os níveis de duas enzimas antioxidantes (CAT e SOD), sugerindo uma atividade mais pronunciadas de proteção contra o EO (**capítulo 1**).

Em relação aos ensaios de citotoxicidade, com os resultados obtidos sugere-se que o uso prolongado destas PMs está associado a alterações de função celular (**capítulo 2**), especialmente daqueles que entram em maior contato pelos mecanismos de absorção e metabolização (epitélio digestivo, fígado, rins). Pois os efeitos citotóxicos observados das PMs analisadas, mostraram um perfil de diminuição de viabilidade celular com o aumento da concentração e tempo de exposição, assim como muitas vezes o uso indiscriminado de chás pela população.

Sabe-se que no organismo complexo não ocorre desta maneira, visto que, o processo de metabolização e excreção estão envolvidos, por isso deve-se levar em consideração este ponto. É essencial considerar que os infusos a base de produtos naturais são misturas complexas de diferentes compostos bioativos, os quais podem atuar sinergicamente ou antagonicamente para determinar seus efeitos.

Em relação ao perfil de citocinas envolvidas com resposta inflamatória (**capítulo 3**), inicialmente, observou-se concentrações de IL-4 maiores em pacientes diabéticos usuários de canela de velho (*M. albicans*) e Insulina (*C. siccoides*). O TNF apresentou níveis aumentados em usuários de *C. siccoides*, em relação aos não usuários desta planta. Mais estudos são necessários para entender o aumento dos níveis de IL-4 e TNF.

Pesquisas com extratos brutos, *ou seja*, na forma que são principalmente consumidos pela população, se tornam importantes para delinear o perfil toxicológico das plantas. Sendo assim, estes dados corroboram com a literatura na pesquisa citotóxica de espécies vegetais que são amplamente utilizadas pela população.

Finalmente, são necessários mais estudos e experimentos *in vitro* para encontrar a confirmação da toxicidade destes infusos, no intuito de verificar o mecanismo dessa toxicidade, analisando a formação de espécies reativas e a ocorrência de apoptose. Para se estabelecer a utilização segura dessas plantas

medicinais, em forma de infuso, também são necessários estudos *in vivo*, para garantir a sua segurança e eficácia, visto que, a prática do uso de PMs é uma realidade da população, por isso a importância de estudos que comprovem a eficácia em seres humanos, contribuindo para estabelecer o perfil de toxicidade e uso a longo prazo em pacientes portadores de DCNT.

REFERÊNCIAS

AQUINO, Vitória Viviane Ferreira et al. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de Croton helliotripifolius e Croton blanchetianus. *Acta Brasiliensis, Paraiba*, v. 1, n. 3, p.7-10, 26 set. 2017.

BERNATONIENE, Jurga; KOPUSTINSKIENE, Dalia Marija. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules, Lithuania*, v. 23, n. 4, p.965-976, 18 abr. 2018.

BRASIL. Constituição (2014). Resolução nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. *RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014. BRASILIA*.

ERHIRHIE, Ernest Oghenesuvwe; IHEKWEREME, Chibueze Peter; ILODIGWE, Emmanuel Emeka. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptanc. *Interdisciplinary Toxicology, Nigeria*, v. 11, n. 1, p.5-12, 13 dez. 2017.

FIGUEIRÓ, Luciana Rizzieri et al. Original Article. Toxicity of *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. leave extract by MTT and neutral red assays: influence of the test medium procedure. *Interdisciplinary Toxicology, Novo Hamburgo*, v. 9, n. 1, p.25-29, 17 maio 2017.

GRACIOLI, Emanuelli Cabral et al. Dispositivos poliméricos cardiovasculares: comportamento termomecânico e viabilidade celular. *Revista Matéria, Novo Hamburgo*, v. 18, n. 2, p.1313-1322, 14 jun. 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 5 ed. New York: Oxford University Press, EUA, 2015.

KHANSARI, Nemat; SHAKIBA, Yadollah; MAHMOUDI, Mahdi. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of AgeRelated Diseases and Cancer. *Recent Patents On Inflammation & Allergy Drug Discovery, Tehran, Iran*, n. 3, p.73-80, 12 set. 2009.

LIU, S.X. et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflamation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, China*, v. 26, p. 1156-1162, fev. 2006.

LUCA M, LUCA A, Calandra C. Accelerated Aging in Major Depression: The Role of Nitro-Oxidative Stress. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2013;5(1):1-6.

LUTFIOĞLU, Müge et al. Gingival crevicular fluid oxidative stress level in patients with periodontal disease and hyperlipidemia. *Braz. Oral Res., Turkey*, v. 3, n. 33, p.100-110, 08 nov. 2017.

MALTA, Deborah Carvalho et al. A implantação do Sistema de Vigilância de Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil, 2003 a 2015: alcances e desafios. Revista Brasileira de Epidemiologia, Belo Horizonte, v. 20, n. 4, p.661-675, dez. 2017.

MARMITT, Dioge J. et al. Plantas Medicinais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. Revista Fitos, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p.129-144, 2015.

OECD, No.129 Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. 2010

PERNAMBUCO, Andrei Pereira. IMPACTO DE UM PROGRAMA DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE SOBRE ASPECTOS NEUROIMUNOCOMPORTAMENTAIS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE FIBROMIALGIA. 2014. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Mg, 2014.

PICKERING, Raelene J et al. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications. Clinical & Translational Immunology, Australia, v. 7, n. 4, p.1016-1036, 2018.

RANG, H.P. et al., Rang & Dale: Farmacologia, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016, 760 p.

VAJRABHAYA, La-ongthong; KORSUWANNAWONG, Suwanna. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. Journal Of Analytical Science And Technology, TAILANDIA, v. 9, n. 1, p.2-6, 13 jul. 2018.

WHO. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2018.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. Ciência & Saúde Coletiva, Blumenau, v. 22, n. 8, p.2703-2712, ago. 2017.

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Você está sendo convidado a participar do projeto institucional intitulado: Plantas medicinais: relação entre uso, terapia medicamentosa e estresse oxidativo, sob responsabilidade da professora Dra. Magda Susana Perassolo. Os objetivos deste estudo são avaliar a influência do consumo de plantas medicinais na terapia medicamentosa e nos níveis de estresse oxidativo em portadores de doenças crônicas.

Sua participação nesta pesquisa será voluntária e consistirá em realizar uma coleta de sangue, realizar raspado bucal e responder aos questionários de avaliação das características gerais dos pacientes e uso de plantas medicinais (composto por 15 questões), de qualidade de vida (Whoqol-bref, com 26 questões), escala de Morisky-Green (composto por 4 questões) e *Brief Medication Questionnaire* (BMQ, com 3 questões) para avaliar a adesão ao tratamento medicamentoso e atividade física (composto por 8 questões). O tempo médio de aplicação de todos os questionários é de 30 min.

Os riscos e/ou desconfortos relacionados a sua participação são o desconforto da picada para retirada do sangue e o raspado bucal para coleta de células da mucosa oral para determinação de micronúcleos, sendo que os procedimentos realizados não envolvem qualquer risco de vida para os pacientes.

O pesquisador responsável e a Universidade Feevale envolvidas nas diferentes fases da pesquisa proporcionarão assistência imediata e integral aos participantes da pesquisa no que se refere às possíveis complicações e danos decorrentes. Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa.

A sua participação nesta pesquisa estará contribuindo para: melhor conhecer as plantas medicinais utilizadas na região e desta forma conhecer melhor seu potencial toxicológico e também suas propriedades terapêuticas, bem como as interações medicamentosas que estas plantas podem ter com os medicamentos utilizados de rotina em portadores de doenças crônicas.

Garantimos o sigilo de seus dados de identificação primando pela privacidade e por seu anonimato. Manteremos em arquivo, sob nossa guarda, por 5 anos, todos os dados e documentos da pesquisa. Após transcorrido esse período, os mesmos serão destruídos. Os dados obtidos a partir desta pesquisa não serão usados para outros fins além dos previstos neste documento. Você tem a liberdade de optar pela participação na pesquisa e retirar o consentimento a qualquer momento, sem a necessidade de comunicar-se com o(s) pesquisador(es).

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será rubricado em todas as folhas e assinado em duas vias, permanecendo uma com você e a outra deverá retornar ao pesquisador. Abaixo, você tem acesso ao telefone e endereço eletrônico institucional do pesquisador responsável, podendo esclarecer suas dúvidas sobre o projeto a qualquer momento no decorrer da pesquisa.

Nome do pesquisador resp.: Magda Susana Perassolo

Telefone institucional do pesquisador resp.: 3586-8800 ramal 8938 ou 9040

E-mail institucional do pesquisador resp.: magdaperassolo@feevale.br

Assinatura do pesquisador responsável

Local e data: _____, ____ de ____ 20 ____.

Declaro que li o TCLE: concordo com o que me foi exposto e aceito participar da pesquisa proposta.

Assinatura do participante da pesquisa

ANEXO II**QUESTIONÁRIO - CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PACIENTE**

Nome: _____ Data: ____ / ____ / ____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: ____ anos Sexo: () M () F

Escolaridade: () analfabeto () fundamental incompleto () fundamental completo
 () médio incompleto () médio completo () superior incompleto
 () superior completo () pós-graduação

Qual a sua renda mensal familiar? _____

Tabagismo () sim () não Tempo____ quantidade____ ex-fumante há____ anos/meses

Alcoolismo () sim () não Tempo____ quantidade____ ex-fumante há____ anos/meses

Peso _____ kg Altura _____ IMC _____ (a ser calculado)

Pressão Arterial _____ Faz uso de vitaminas/antioxidantes () sim () não

Se utiliza, qual (is) _____

Demais patologias:

Patologia	Tempo diagnóstico

Uso de medicamentos:

Número	Medicamento	Dose	Indicação	Tempo de uso
1				
2				
3				
4				

USO DE PLANTAS MEDICINAIS

Faz uso de plantas medicinais? Sim () Não ()

Planta	Tempo de uso	Forma de uso	Motivo do uso	Posologia	Eficácia
		Tópico () Oral ()			Sim () Não ()
		Tópico () Oral ()			Sim () Não ()

Você iniciou o uso destas plantas de que forma?

() indicação de alguém () vontade própria () meio de comunicação
Qual? _____

Você faz uso de chás para se tratar?

() Sim () Não

De que forma você os prepara?

() decocção () infusão () maceração () outro.

Qual: _____

Na sua opinião, qual a importância no uso de plantas medicinais na sua vida e no seu tratamento?

() pouco importante () importante () muito importante () sem opinião

Você acredita que as plantas medicinais são mais eficazes do que os medicamentos?

() Sim () Não () Tanto quanto () sem opinião
Se afirmativo, por quê? _____

Você acredita que as plantas medicinais possam causar algum mal se usadas de forma errada?

() Sim () Não Por quê? _____

Você gostaria de ter maiores informações sobre o uso de plantas medicinais na sua cidade?

() Sim () Não

Se afirmativo, como? () pelos jornais () folhetos () palestras () cursos outros: _____

Para qual profissional você escolheria pedir orientações sobre o uso correto de plantas medicinais?

() Médico () Farmacêutico () Dentista () Enfermeiro () Outro _____

ANEXO III
APROVAÇÃO DO CEP


**UNIVERSIDADE
FEEVALE/ASSOCIAÇÃO PRÓ-
ENSINO SUPERIOR EM NOVO**


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Plantas medicinais: relação entre uso, terapia medicamentosa e estresse oxidativo

Pesquisador: MAGDA SUSANA PERASSOLO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62834916.0.0000.5348

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO PRO ENSINO SUPERIOR EM NOVO HAMBURGO

Patrocinador Principal: ASSOCIAÇÃO PRO ENSINO SUPERIOR EM NOVO HAMBURGO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.948.129

Apresentação do Projeto:

De acordo.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de

Endereço: RS 239, nº 2755

Bairro: Vila Nova

CEP: 93.525-075

UF: RS

Município: NOVO HAMBURGO

Telefone: (51)3586-8800

Fax: (51)3586-8800

E-mail: ranielli@feevale.br

Continuação do Parecer: 1.948.129

Saúde, e com as normas internas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale, todos os documentos necessários à análise do projeto acima referido por este Comitê foram apresentados.

Este projeto preserva os aspectos éticos dos sujeitos da pesquisa, sendo, portanto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale.

Reiteramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição encontra-se à sua disposição para equacionar eventuais dúvidas e/ou esclarecimentos que se fizerem necessários.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJECTO_837693.pdf	16/01/2017 10:54:58		Aceito
Outros	IPAQCurto.pdf	16/01/2017 10:54:43	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
Outros	CARACTERISTICAS.docx	16/01/2017 10:54:26	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
Outros	WHOQOL.docx	16/01/2017 10:54:11	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	16/01/2017 10:53:51	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	formulario.docx	16/01/2017 10:53:33	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
Outros	formulario.pdf	16/01/2017 10:52:42	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisador.pdf	16/01/2017 10:52:09	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	16/01/2017 10:51:48	MAGDA SUSANA PERASSOLO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: RS 239, nº 2755

Bairro: Vila Nova

CEP: 93.525-075

UF: RS

Município: NOVO HAMBURGO

Telefone: (51)3586-8800

Fax: (51)3586-8800

E-mail: ranieli@feevale.br

COMITÉ DE ÉTICA EM
PESQUISA - CEPUNIVERSIDADE
FEVALE/ASSOCIAÇÃO PRÓ-
ENSINO SUPERIOR EM NOVO

Continuação do Parecer: 1.948.129

NOVO HAMBURGO, 03 de Março de 2017

Assinado por:**Ranieli Gehlen Zapelini**
(Coordenador)

ANEXO IV
CERTIFICADOS


CERTIFICADO

Concedemos ao trabalho

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA EM PORTADORES DE DOENÇAS CRÔNICAS DA REGIÃO DO VALE DO SINOS - RS,

de autoria de

BRUNA SCHERER SEIBERT, LARISSA SELBACH DRIES, JULIANA RAQUEL RAASCH, TAINARA GOMES VARGAS

e orientação de

MAGDA SUSANA PERASSOLO, ANDRESA HEEMANN BETTI,

este certificado de apresentação no evento

FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (FIC) - INOVAMUNDI 2019,

realizado no período de 21 a 26 de outubro de 2019.

Âmbito: Internacional

Promoção: Universidade Feevale - Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Organização: Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Novo Hamburgo, 19 de dezembro de 2019.



Dr. João Alcione Sganderla Figueiredo
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

CERTIFICADO

Concedemos ao trabalho

TOXICIDADE IN VITRO DO INFUSO DE MENTHA PULEGIUM EM CÉLULAS 3T3,

de autoria de

NATASCHA DA ROSA SILVA, TAINARA VARGAS DE OLIVEIRA, ALANA WITT HANSEN

e orientação de

ANA LUIZA ZIULKOSKI, MAGDA SUSANA PERASSOLO,

este certificado de apresentação no evento

FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (FIC) - INOVAMUNDI 2019,

realizado no período de 21 a 26 de outubro de 2019.

Âmbito: Internacional

Promoção: Universidade Feevale - Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Organização: Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Novo Hamburgo, 20 de dezembro de 2019.



Dr. João Alcione Sganderla Figueiredo
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

CERTIFICADO

Concedemos ao trabalho

TRILAGEM FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL IN VITRO DOS INFUSOS DE ACHYROCLINE SATUREOIDES, CYMBOPOGON CITRATUS, MATRICARIA CHAMOMILLA E MENTHA

PULE GIUM,

de autoria de

AMANDA SCHUPONATH, STEPHANY JORDÂNIA CHAGAS ORELI, TAINARA GOMES VARGAS

e orientação de

EDNA SAYURI SUYENAGA, MAGDA SUSANA PERASSOLO,

este certificado de apresentação no evento

FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (FIC) - INOVAMUNDI 2019,

realizado no período de 21 a 26 de outubro de 2019.

Âmbito: Internacional

Promoção: Universidade Feevale - Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Organização: Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Novo Hamburgo, 19 de dezembro de 2019.



Dr. João Alcione Sganderla Figueiredo
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão


Interações farmacológicas em pacientes da rede pública de saúde.

Lucas Franzoni¹; Tainata Gomes Vargas¹; César Augusto Miorelli Campos¹; Magda Susana Perassolo²

A interferência na resposta farmacológica ou clínica causada por um segundo agente ministrado antes ou concomitantemente a uma substâncias é o que define interação farmacológica. Os resultados possíveis das interações farmacológicas entre medicamentos incluem falha no tratamento e toxicidade clínica. Este trabalho verificou os usos concomitantes de medicamentos e as interações farmacológicas presentes em uma população de município do RS. Os dados foram trabalhados para definir as substâncias mais utilizadas pelos pacientes e, em seguida, quais as substâncias participavam com mais frequência de usos concomitantes. Para as 6 substâncias mais utilizadas, foram verificadas todas as interações farmacológicas através do serviço DRUG INTERACTION CHECKER, disponível no portal MEDSCAPE. Assim, discriminou-se aquelas interações cujos efeitos eram conhecidos daquelas cujos efeitos eram nulos. Apresentamos os resultados desta seleção, destacando os possíveis efeitos da interação entre as substâncias utilizadas pelos participantes da pesquisa. O uso concomitante de substâncias pode gerar interações diversas entre as mesmas. Os mecanismos de interações químicas podem ser farmacocinéticos ou farmacodinâmicos. Os mecanismos farmacocinético influenciam a biotransformação, a distribuição, a absorção ou a excreção da substância pelo organismo. Já os mecanismos farmacodinâmicos estão relacionados com a interação da substância com receptores participantes do ciclo metabólico responsável pelos efeitos de um medicamento

CERTIFICADO

Concedemos ao trabalho

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENTES CRÔNICOS USUÁRIOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO SINOS,

de autoria de

TAINARA VARGAS DE OLIVEIRA, CÉSAR AUGUSTO MORELI CAMPOS, JULIANA RAQUEL RAASCH, DIOVANA ROLIM MINETO

e orientação de

MAGDA SUSANA PERASSOLO, ANA LUIZA ZILKOSKI,

este certificado de apresentação no evento

SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO (SPG) - INOVAMUNDI 2018.

realizado no período de 22 a 27 de outubro de 2018.

Âmbito: Internacional

Promoção: Universidade Feevale - Pro-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Organização: Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Novo Hamburgo, 17 de dezembro de 2018.


Dr. João Alcione Sganderla Figueiredo
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão