



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

DIEGO THIERS OLIVEIRA CARNEIRO

EXTRATO DA FOLHA DE *Chenopodium ambrosioides* Linn (MASTRUZ)
ATENUA A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM RATOS

FORTALEZA

2020

DIEGO THIERS OLIVEIRA CARNEIRO

EXTRATO DA FOLHA DE *Chenopodium ambrosioides* Linn
(MASTRUZ) ATENUA A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NA
PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de Concentração: Morfofisiologia Óssea e Articular

Orientadora: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C288e Carneiro, Diego Thiers Oliveira.

Extrato da folha de *Chenopodium ambrosioides* linn (mastruz) atenua a perda óssea alveolar na periodontite experimental em ratos / Diego Thiers Oliveira Carneiro. – 2021. 59 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra.

1. Periodontite. 2. *Chenopodium ambrosioides*. 3. Perda do osso alveolar. 4. Inflamação. I. Título.

CDD 611

DIEGO THIERS OLIVEIRA CARNEIRO

EXTRATO DA FOLHA DE *Chenopodium ambrosioides* Linn
(MASTRUZ) ATENUA A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NA
PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro

Aprovada em: 09/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Mirna Marques Bezerra Brayner
Universidade Federal do Ceará – UFC SOBRAL

Profa. Ana Patrícia Sousa de Lima Alcantara
Universidade de Fortaleza– UNIFOR

FORTALEZA

2020

À minhas filhas e à minha esposa

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter permitido que eu chegasse até aqui me acolhendo em todos os momentos sem nunca me abandonar.

Aos meus pais, **Liduína e Edgar**, por sempre ter me mostrado o caminho do bem e por ter permitido viver meu sonho desde o início da minha carreira como estudante e profissional.

A minha esposa, **Alessandra Honório**, por ter me apoiado em todos os momentos de dificuldades na construção dos meus sonhos, por ser tão especial na minha vida e por, muitas vezes, ter se dedicado nos muitos momentos da minha ausência, mesmo sem questionar. Nossas filhas têm um grande exemplo de mulher e mãe.

A minha sogra e ao meu sogro, **Eva e Amaro**, que sempre acolheram a mim e a minha família agindo como verdadeiros pais receptivos e amorosos mesmo nos momentos mais difíceis durante esta caminhada.

A minha orientadora, **Professora Dra. Paula Goes**, por ter acreditado no meu potencial e ter aceitado ser minha orientadora sempre agindo com exatidão e competência no que se propõe a fazer.

A todos que fazem parte do Departamento de Morfologia em especial aos **Professores e aos colegas Helson Silveira, Howard Ribeiro e Carlos Roberto** que permitiram sempre a troca de conhecimento e de boas conversas descontraídas.

A todos os colegas de Pós-Graduação, **Gisele Barreto, Bruno Ferreira, Lorena Vasconcelos, Bárbara Carneiro, Jonas Gusmão e Francisco das Chagas** que se propuseram a ajudar nesta minha caminhada sempre que possível.

A todos os **profissionais técnicos e auxiliares** que se mostraram dispostos a permitir a pesquisa nos mais diferentes Departamentos desta Instituição.

RESUMO

A planta *Chenopodium ambrosioides* L. possui várias ações biológicas dentre elas a estimulação de neoformação óssea e prevenção de perda óssea. A principal sequela da doença periodontal é a perda do periodonto de sustentação causada pela progressão da doença que leva, muitas vezes, a perda do elemento dentário. Considerando as ações biológicas do mastruz no metabolismo do tecido ósseo, este trabalho avaliou as ações anti-inflamatórias e antirreabsortiva óssea do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na periodontite em ratos. Para tanto, 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos (200 g) foram divididos em 5 grupos (n=6): grupo controle negativo (CN) não foi submetido a doença periodontal nem recebeu nenhum tratamento; grupo controle positivo (CP) submetido a periodontite experimental e tratado com 2 ml/kg de 0,9% de solução salina (vo); grupo (M3): teve a periodontite experimental induzido e foi tratado com o extrato na dose de 3 mg/kg; grupo (M10) submetido a periodontite induzido e foi tratado com o extrato na dose de 10 mg/kg; grupo (M30) submetido a periodontite experimental induzido e foi tratado com o extrato na dose de 30 mg/kg. O extrato foi administrado por via oral 30 minutos antes da indução da periodontite e diariamente até 10^o dia, quando no 11^o dia os animais foram eutanasiados. Para analisar o tipo de flavonoide presente no extrato foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência. Quando da eutanásia, as maxilas foram removidas para a análise macroscópica, histológicas e histométrica. Os rins, fígado e estômago foram também coletados para investigar o potencial lesivo causado pela administração do Mastruz. Foi identificado que o flavonoide Rutina estava presente no extrato de forma majoritária. Os resultados deste estudo mostraram que nos animais do grupo (M30) houve redução de 41,3% da perda óssea, 24,7% de aumento no número de osteoblasto e 51,3% de diminuição de osteoclasto por perímetro ósseo (p<0,05) quando comparado ao grupo CP. Os animais que receberam o extrato de não apresentaram lesão hepática, renal ou gástrica irreversível. Em suma podemos concluir que o extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. apresenta efeito anti-inflamatório e antirreabsortivo de forma dose dependente, e pode ser uma importante ferramenta farmacológica como adjuvante ao tratamento da periodontite.

Palavras-chave: Periodontite, *Chenopodium ambrosioides*, Perda do Osso Alveolar, Inflamação

ABSTRACT

The *Chenopodium ambrosioides* L. plant has several biological actions, including the stimulation of new bone formation and prevention of bone loss. The main sequela of periodontal disease is the loss of the sustaining periodontium caused by the progression of the disease, which often leads to the loss of the dental element. Considering the biological actions of the mast in bone tissue metabolism, this work evaluated the anti-inflammatory and bone anti-resorptive actions in periodontitis with the treatment of the hydroalcoholic extract of the plant leaf administered orally in male Wistar rats. For this purpose, 30 male wistar rats (*Rattus norvegicus*) (200 g) were divided into 5 groups (n = 6): negative control group (CN) was not submitted to periodontal disease nor received any treatment; positive control group (CP) submitted to experimental periodontitis and treated with 2 ml / kg of 0.9% saline solution (vo); group (M3): had experimental periodontitis induced and was treated with the extract at a dose of 3 mg / kg; group (M10) subjected to induced periodontitis and was treated with the extract at a dose of 10 mg / kg; group (M30) subjected to induced experimental periodontitis and was treated with the extract at a dose of 30 mg / kg. The extract was administered orally 30 minutes before the induction of periodontitis and daily until the 10th day, when on the 11th day the animals were euthanized. To analyze the type of flavonoid present in the extract, high performance liquid chromatography was performed. Upon euthanasia, the jaws were removed for macroscopic, histological and histometric analysis. The kidneys, liver and stomach were also collected to investigate the harmful potential caused by the administration of Mastruz. It was identified that the flavonoid Rutina was present in the extract in a major form. The results of this study showed that in the animals in the (M30) group there was a 41.3% decrease in bone loss, a 24.7% increase in the number of osteoblasts and a 51.3% decrease in osteoclasts by bone perimeter ($p < 0.05$) when compared to the CP group. The animals that received the extract did not show any liver, kidney or gastric damage. In summary, we can conclude that *Chenopodium ambrosioides* L. extract has an anti-inflammatory and anti-resorptive effect in a dose-dependent manner, and can be an important pharmacological tool as an adjunct to the treatment of periodontitis.

Keywords: Periodontitis, *Chenopodium ambrosioides*, Alveolar Bone Loss, Inflammation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	7
2. PROPOSIÇÃO	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. CAPÍTULOS	11
3.1 Capítulo 1	13
4. CONCLUSÃO GERAL.....	39
5. REFERÊNCIAS	40

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

A doença periodontal é definida como doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela distribuição progressiva do aparato de inserção dental. Além disso, determinados fatores ambientais, como estresse psicossocial e tabagismo, podem acelerar o início e o progressão da doença periodontal (STEFFENS et al., 2018).

O Projeto SB Brasil 2010 indica que 68% dos indivíduos de 12 anos, 51% entre 15 a 19 anos, 17% para adultos de 35 a 44 anos e 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos, apresentam problemas periodontais (SB Brasil, 2010).

No processo fisiopatológico da doença periodontal os patógenos sintetizam produtos nocivos e enzimas que destroem a matriz extracelular, como o colágeno e até mesmo a membrana celular do hospedeiro. Uma vez que o processo imune e inflamatório tenha iniciado, diferentes moléculas inflamatórias são liberadas por leucócitos, fibroblastos ou por células dos tecidos periodontais. À medida que a doença periodontal progride as fibras colágenas e a inserção conjuntiva vai sendo destruída. Ao mesmo tempo em que as células do epitélio juncional proliferam apicalmente a superfície das raízes, favorecendo o aparecimento de bolsas periodontais associado a ativação dos osteoclastos que provocam reabsorção óssea (CRUZ et al., 2018; LINS et al., 2007).

As práticas de eliminação do biofilme de forma individual pelo paciente e pelo profissional com as raspagens e alisamentos corono-radiculares são essenciais para o controle da inflamação periodontal (SANCHEZ et al., 2020). Alguns casos clínicos são necessários o uso de adjuvantes na resolutividade da doença periodontal. Os agentes antioxidantes de origem vegetal vêm ganhando destaque como adjuvantes por diminuírem a inflamação no tecido afetado por serem uma alternativa barata e de fácil acesso (CASTRO et al., 2019).

A *Chenopodium ambrosioides* L. é considerada pela a Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das espécies de plantas mais usadas para fins medicinais no mundo. No Brasil, o Ministério da Saúde elencou essa planta em uma lista nacional de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) devido ao seu grau de importância no tratamento de algumas doenças (DEGENHARDT et al., 2016). Na referida lista, de acordo com o SUS, ela ocupa a posição 17 de importância terapêutica no total de 71. Normalmente, a *Chenopodium ambrosioides* L. recebe vários nomes populares a

dependem da região a qual é cultivada. No Brasil é chamada de “Erva-de-Santa-Maria” e “Mastruz”, por exemplo (RIOS et al., 2017).

A *Chenopodium ambrosioides* L. produz diversos metabólitos secundários responsáveis pelas suas atividades farmacológicas como, por exemplo, o óleo essencial, polifenóis, catequinas, esteroides, taninos e triterpenos. Estes são os princípios ativos responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2014). Suas atividades farmacológicas incluem capacidade citotóxica, antitumoral, ansiolítica, antipirética, analgésica, anti-inflamatória, imunoestimuladora, antiviral, antibacteriana, antifúngica, tripanocida, antiplasmoídea, antileishmanial, antiequistossomal, anti-helmíntica (CALADO et al., 2015; SILVA et al., 2014) estimuladora de neoformação óssea (NETO et al., 2017) e prevenção de perda óssea (SOARES et al., 2015).

Os efeitos anti-inflamatórios da *Chenopodium ambrosioides* L. é causado pela presença de flavonoides em sua composição, metabólitos secundários mais presente nos vegetais. Eles pertencem a classe dos polifenóis e são subclassificados como chalconas, flavonas, flavanonóis, flavanonas, isoflavona, flavon-3-ols e antocianidinas (CANO et al., 2016). Os flavonoides majoritários neste vegetal são a quecertina e o kaempferol (ZAGO et al., 2019; RIOS et al., 2017; NOWAK et al., 2016; GOHAN et al., 1997; JAIN et al., 1990), mas ainda pode ser constituídos por outros flavonoides como, por exemplo, a rutina que possui atividades farmacológica direcionadas ao seu potencial anti-inflamatório.

Neste contexto, sabendo que o sucesso na terapia da periodontite está diretamente relacionado à resolução da inflamação, às condições de saúde do indivíduo e ao controle da placa bacteriana, o uso de agentes farmacológicos que modulem essas variáveis ganham destaque. Os fitoterápicos apresentam-se como opções a esta condição e a *Chenopodium ambrosioides* L. parece um agente promissor quando se fala na sua capacidade anti-inflamatória e sua influência no metabolismo ósseo.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliação do efeito anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da *Chenopodium ambrosioides* L. em ratos submetidos à periodontite experimental.

2.2 Objetivos específicos

Nos ratos submetidos à periodontite e tratados com *Chenopodium ambrosioides* L. foram avaliados:

- Análise fitoquímica do extrato por Cromatografia de Alta Eficiência;
- Acompanhar a evolução da massa corporal diária dos animais;
- A perda óssea por análise macroscópica;
- O aspecto histopatológico do tecido periodontal;
- A contagem de osteoblasto e osteoclasto por milímetro de osso através de análise histométrica;
- Avaliar o potencial citotóxico tecidual no estômago, fígado e rim.

3. CAPÍTULOS

Esta dissertação de Mestrado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado.

Capítulo 1

“Avaliação do efeito anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da *Chenopodium ambrosioides* L. em ratos submetidos à periodontite experimental.” Diego Thiers Oliveira Carneiro, Paula Goes.

(Journal of Ethnopharmacology)

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico: *Journal of Ethnopharmacology*

ISSN 0378-8741

Qualis capes: A2

Fator de impacto: 3.414

Capítulos

3.1 Capítulo 1

“Extrato da folha de *Chenopodium ambrosioides* Linn (Mastruz) atenua a perda óssea alveolar na periodontite experimental em ratos”

Diego Thiers Oliveira Carneiro, Paula Goes.

RESUMO

A planta *Chenopodium ambrosioides* L. possui várias ações biológicas dentre elas a estimulação de neoformação óssea e prevenção de perda óssea. A principal sequela da doença periodontal é a perda do periodonto de sustentação causada pela progressão da doença que leva, muitas vezes, a perda do elemento dentário. Considerando as ações biológicas do mastruz no metabolismo do tecido ósseo, este trabalho avaliou as ações anti-inflamatórias e antirreabsortiva óssea do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na periodontite em ratos. Para tanto, 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos (200 g) foram divididos em 5 grupos (n=6): grupo controle negativo (CN) não foi submetido a doença periodontal nem recebeu nenhum tratamento; grupo controle positivo (CP) submetido a periodontite experimental e tratado com 2 ml/kg de 0,9% de solução salina (vo); grupo (M3): teve a periodontite experimental induzido e foi tratado com o extrato na dose de 3 mg/kg; grupo (M10) submetido a periodontite induzido e foi tratado com o extrato na dose de 10 mg/kg; grupo (M30) submetido a periodontite experimental induzido e foi tratado com o extrato na dose de 30 mg/kg. O extrato foi administrado por via oral 30 minutos antes da indução da periodontite e diariamente até 10^o dia, quando no 11^o dia os animais foram eutanasiados. Para analisar o tipo de flavonoide presente no extrato foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência. Quando da eutanásia, as maxilas foram removidas para a análise macroscópica, histológicas e histométrica. Os rins, fígado e estômago foram também coletados para investigar o potencial lesivo causado pela administração do Mastruz. Foi identificado que o flavonoide Rutina estava presente no extrato de forma majoritária. Os resultados deste estudo mostraram que nos animais do grupo (M30) houve redução de 41,3% da perda óssea, 24,7% de aumento no número de osteoblasto e 51,3% de diminuição de osteoclasto por perímetro ósseo ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CP. Os animais que receberam o extrato de não apresentaram lesão hepática, renal ou gástrica irreversível. Em suma podemos concluir que o extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. apresenta efeito anti-inflamatório e antirreabsortivo de forma dose dependente, e pode ser uma importante ferramenta farmacológica como adjuvante ao tratamento da periodontite.

Palavras-chave: Periodontite, *Chenopodium ambrosioides* L., perda óssea, inflamação.

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é definida como doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela distribuição progressiva do aparato de inserção dental (STEFFENS et al., 2018).

No processo fisiopatológico da doença periodontal os patógenos sintetizam produtos nocivos e enzimas que destroem a matriz extracelular, afetando o colágeno e até mesmo a membrana celular do hospedeiro. Uma vez que o processo imune e inflamatório tenha iniciado, diferentes moléculas inflamatórias são liberadas por leucócitos, fibroblastos ou por células dos tecidos periodontias. À medida que a doença periodontal progride as fibras colágenas e a inserção conjuntiva vai sendo destruída. Ao mesmo tempo em que as células do epitélio juncional proliferam apicalmente a superfície das raízes, favorecendo o aparecimento de bolsas periodontais associado a ativação dos osteoclastos que provocam reabsorção óssea (CRUZ et al., 2018; LINS et al., 2007).

As práticas de eliminação do biofilme de forma individual pelo paciente e pelo profissional com as raspagens e alisamentos corono-radiculares são essenciais para o controle da inflamação periodontal (SANCHEZ et al., 2020). Alguns casos clínicos são necessários o uso de adjuvantes na resolutividade da doença periodontal. Os agentes antioxidantes de origem vegetal vêm ganhando destaque como adjuvantes por diminuírem a inflamação no tecido afetado por serem uma alternativa de baixo custo e de fácil acesso (CASTRO et al., 2019).

Esta planta é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das mais usadas para fins medicinais no mundo. No Brasil, o Ministério da Saúde elencou essa planta em uma lista nacional de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) devido ao seu grau de importância no tratamento de algumas doenças (DEGENHARDT et al., 2016). Na referida lista, de acordo com o SUS, ela ocupa a posição 17 de importância terapêutica no total de 71. Normalmente, a *Chenopodium ambrosioides* L. recebe vários nomes populares a depender da região a qual é cultivada. No Brasil é chamada de “Erva-de-Santa-Maria” e “Mastruz”, por exemplo (RIOS et al., 2017).

2 MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo experimental prospectivo, randomizado, controlado e cego, utilizando modelo animal. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) guidelines para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010). Os experimentos foram iniciados logo após aprovação do projeto de pesquisa submetido ao Comitê de Ética de uso Animal (CEUA) da UFC (número 149/2017).

2.2 Preparo do Extrato Bruto Hidroalcolólico (EBH) da *Chenopodium ambrosioides* Linn

A planta foi coletada na horta de coordenadas geográficas 3°49'26.7"S 38°32'43.1"W, em Fortaleza, Ceará, Brasil. Após a coleta, as plantas foram levadas ao Laboratório de Análises Fitoquímicas de Plantas Medicinais (LAFIPLAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O protocolo adotado por Silva et al. (2014) preconiza que a preparação do EBH aconteça com a secagem da amostra vegetal em estufa com circulação de ar e temperatura máxima de 38°C seguido de trituração em moinhos de facas. O material seco (200 g aproximadamente) e moído foi submetido à maceração fracionada com emprego do etanol a 70% (1000 mL), mantendo em contato por 24 horas; com repetição da operação de maceração por quatro vezes com renovação da mesma quantidade do solvente. O material obtido das quatro etapas foi filtrado e submetido a concentração sob pressão reduzida em rotoevaporador. O extrato seco concentrado obtido foi então diluído em água bidestilada para uso nos ensaios biológicos nas concentrações de 5 mg de extrato por ml (5 mg/ml) e posteriormente administrados nos animais nas doses de 3; 10 e 30mg/kg de animal.

2.3 Análise do extrato pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise do extrato hidroalcolólico por CLAE foi realizada por cromatograma líquido (SHIMADZU, Japão), constituído por duas bombas de alta pressão, modelo LC-20AT, desgaseificador tipo DGU-20AS, detector UV-vis, modelo SPD-M20A usado o canal de 270 nm e forno termostático, modelo CTO-20A, mantido a 35°C. Utilizou-se coluna analítica Phenomenex RP-C₁₈ (250 x 4,6 mm) e sistema de fase móvel

constituída por A [H₂O (0,1% TFA) Milliq da Milipore] e B [MeCN (grau CLAE) da Tedia], num sistema de gradiente variando de 5-100% de B em 30 min e mais 10 min com 100% de B. Os solventes foram filtrados em membrana de nylon PIFE com poros de 0,45 µm. As amostras foram dissolvidas com os solventes usados na fase móvel e filtradas em filtro do tipo PTFE/B 0,45 µm da Unichro. A identificação dos componentes do extrato para flavonoide foi realizada por comparação com padrão de flavonoide puros e glicosilados isolados de vegetais, pelo tempo de retenção (t_R) e UV.

2.4 Seleções de animais

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea de 200 a 250 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC. Todos receberam ração comercial balanceada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22 °C durante todo o experimento. Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais e apreciadas pelo comitê de pesquisa em animais institucional.

2.5 Modelo de indução da periodontite eutanásia

Para indução da perda óssea inflamatória foi utilizado o modelo de periodontite induzido por ligadura baseado em Lima et al. (2004), o qual consiste na inserção de um fio de sutura de náilon 3.0, em torno do 2º molar superior esquerdo de um rato sob anestesia com Ketamina e Xilazina (80 mg/kg de Ketamina + 10 mg/kg de Xilazina por via intramuscular). Logo em seguida a passagem do fio, foi dado um nó cirúrgico voltado para a face vestibular da boca do rato. Os animais foram eutanasiados, por meio de doses três vezes maior a dose utilizada na indução da doença periodontal por via intraperitoneal no 11º dia.

2.6 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos experimentais como segue:

a) Grupo Controle Negativo (CN): grupo de 6 animais não submetidos a nenhum tipo de tratamento;

b) Grupo Controle Positivo (CP): grupo de 6 animais submetidos a periodontite que receberam solução salina 0,9% na dose de 2 ml/kg por via oral;

c) Grupos Experimentais *Chenopodium ambrosioides* Linn (M3/M10/M30): Os animais foram subdivididos em 3 grupos de 6 animais cada. Cada subgrupo foi induzido a periodontite e receberam o extrato hidroalcoólico da folha da planta diluído em água bidestilada para ser administradas nas doses de 3 (**M3**), 10 (**M10**) e 30 mg/kg (**M30**), por via oral (PATRÍCIO et al., 2008; ASSAIDE et al., 2014; CALADO et al., 2015).

2.7 Variação da massa corporal

O peso em gramas dos animais foi aferido no primeiro dia e acompanhado diariamente até o 11º dia quando aconteceu a eutanásia. A variação da massa corporal foi calculada mediante a diferença em relação ao primeiro dia do experimento.

2.8 Estudo morfométrico do tecido ósseo alveolar

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. Logo em seguida, as maxilas foram separadas em duas hemiarçadas, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de discriminar tecido ósseo dos dentes (LIMA et al., 2004; GOES et al., 2010; 2012). Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarçadas foram acomodadas em cera em lâminas para microscópio, e seguiram para posterior fotografia em câmera digital (modelo D-5100, Nikon, São Paulo - SP). Todas as imagens foram feitas com papel milimetrado de área conhecida para posterior conversão de pixel para mm². As imagens foram lançadas em Software IMAGE J® para a quantificação da perda óssea alveolar (POA). A área de reabsorção considerada da hemiarçada onde a periodontite foi induzida foram a medida da área da ponta de cúspide até a borda óssea remanescente, subtraída da respectiva área na hemiarçada contralateral, controle próprio do animal. Esta área foi apresentada em mm² (GOES et al., 2010).

2.9 Análise histopatológica do tecido periodontal

Após a eutanásia dos animais e excisão da maxila, os espécimes foram fixados em formalina neutra a 10% e desmineralizadas em EDTA a 10%. Após a reidratação os espécimes foram mergulhados em parafina e seccionados em cortes de 4µm na região do primeiro e segundo molar no sentido mesio-distal para a coloração posterior em hematoxilina e eosina e avaliação em microscópio de luz polarizada (40x). Foram avaliadas células do infiltrado inflamatório, números de osteoblastos e osteoclastos, integridade do osso alveolar e cemento. Os grupos experimentais foram avaliados seguindo os critérios descritos por Leitão et al. (2005). Escore 0 – Sem ou discreto infiltrado inflamatório (células inflamatórias esparças e restritas na região de gengiva marginal). Processo alveolar e cemento preservado. Escore 1 – Infiltrado inflamatório moderado (células inflamatórias presente em toda a extensão da gengiva). Pequena reabsorção do processo alveolar e cemento intacto. Escore 2 – Acentuado infiltrado inflamatório (infiltrado inflamatório na gengiva e ligamento periodontal). Acentuada degradação do processo alveolar e destruição parcial do cemento. Escore 3 – Acentuado infiltrado inflamatório, completa absorção do processo alveolar e severa destruição do cemento.

2.10 Análise histomorfométrica do osso alveolar

Os blocos em parafina preparados para a histopatologia foram usados para obter novos cortes que foram corados em hematoxilina e eosina, para contagem de osteoblasto por perímetro ósseo, e em fosfatase ácido resistente (TRAP), para contagem de osteoclasto por milímetro de osso. Ao final do processo, foram obtidos 5 campos no aumento de 400x na região interproximal entre o primeiro e segundo molar superior. A contagem das células osteoblastos e osteoclastos por perímetro ósseo (N.Ob/B.Pm e N.Oc/B.Pm) se deu com auxílio do software ImageJ® (Instituto Nacional de Saúde, EUA) (GOES et al., 2019).

2.11 Efeito da administração do extrato em Estômago, Fígado e Rins

Após a eutanásia dos animais o estômago, fígado e rins foram removidos cirurgicamente pesados e feito a relação com o peso corporal no dia da eutanásia (Peso do órgão/Peso do animal) e depois fixados em formal a 10% por 24h. Em seguida os órgãos foram incluídos em parafina para posterior coloração com

hematoxilina e eosina. Foram realizadas as análises morfológicas teciduais em microscópio de luz para avaliação da toxicidade tecidual geradas ou não pela administração do extrato da *Chenopodium ambrosioides* L. Foi feita análise semi-quantitativa e escores de 0 a 3. Os escores representam; escore 0 – Característica histopatológica avaliada em ausente. Escore 1- Característica histopatológica avaliada em leve. Escore 2 – Característica histopatológica avaliada como moderada. Escore 3 - Característica histopatológica avaliada como severa. (RIBEIRO et al., 2016; PINTO et al., 2019)

Na região de cárdia do estômago foram analisadas a presença de vasos ectásicos e hemorragia tecidual. Na região de fundo do estômago foram analisadas a presença de glândulas de mucosa gástricas, presença de vasos ectásicos, hemorragia tecidual, presença de infiltrado inflamatório, perda de células e edema tecidual. No fígado, foram avaliados a congestão da veia porta e veia centro lobular, edema de hepatócito, hemorragia sinusoidal e presença de infiltrado inflamatório. Nos rins, foram avaliados o edema de células do epitélio tubular, vacuolização de célula do epitélio tubular, hemorragia intersticial e tubular recentes, necrose nefrotóxica, cilindro hialino e perda de células. (PINTO et al, 2019; RIBEIRO et al., 2016).

2.12 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram apresentados como média±erro padrão da média (E.P.M.) e realizado teste de análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, no caso de homocedasticidade de variâncias. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana (valores extremos), sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Em todas as situações foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$. O software que utilizado para todas as análises foi o GraphPad Prism® versão 6.0.

3. RESULTADOS

3.1 O Extrato Bruto Hidroalcoólico da *Chenopodium ambrosioides* L. apresenta picos de rutina

A caracterização do extrato bruto hidroalcoólico da folha da *Chenopodium ambrosioides* L. foi realizada por CLAE com a máquina calibrada para detecção de flavonoides que nesse extrato inicia após o quinto minuto. O padrão puro de

quercetina e de rutina glicosilada também foram submetidas a leitura conforme figura 1. O tempo de retenção de flavonóides no extrato na coluna de C-18 aconteceu entre o minuto 9 e o minuto 13. O tempo de retenção da rutina na coluna de C-18 também aconteceu no intervalo de tempo entre o minuto 9 e 13. O tempo de retenção da quercetina pura na coluna de C-18 foi entre o minuto 22 e o minuto 24.

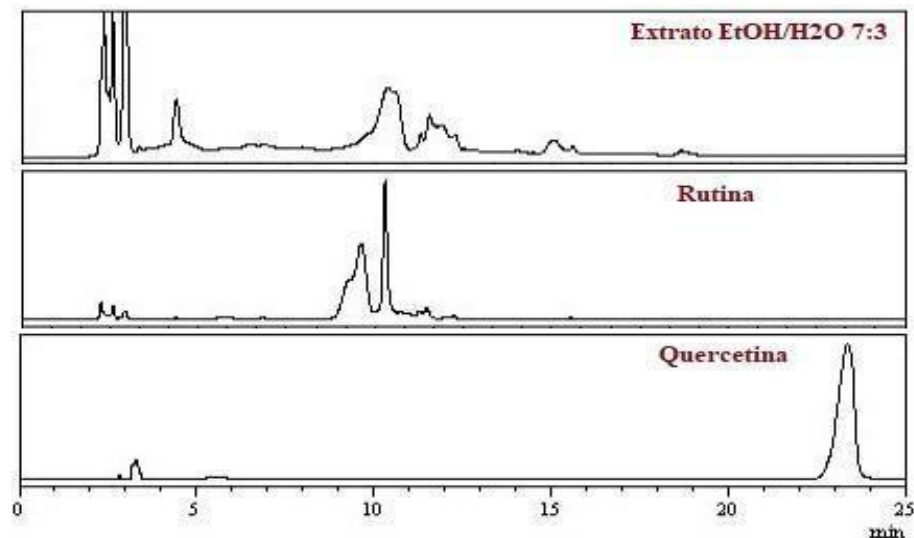


Figura 1. Cromatograma do extrato hidroalcoólico e padrões de rutina e de quercetina.

3.1 O extrato de *Chenopodium ambrosioides* previne perda óssea alveolar e modula o processo inflamatório periodontal

Na figura 2 é possível observar o efeito protetor do extrato de *Chenopodium ambrosioides* no tecido ósseo alveolar. O modelo de periodontite foi eficaz, uma vez que causou intensa perda óssea alveolar ($6,17 \pm 0,69 \text{ mm}^2$) (Figura 2Q) com lesão de furca e exposição radicular como visto na análise macroscópica (Figura 2B) quando comparado ao grupo CN ($0,95 \pm 0,42 \text{ mm}^2$) (Figura 2A). A análise histológica confirmou os achados macroscópicos em relação ao tecido ósseo. Além disso, foi visto intenso infiltrado inflamatório no tecido periodontal no grupo CP (Figura 2G; Tabela 1) quando comparado a CN (Figura 2F). Na análise histométrica foi observado uma redução significativa do número de osteoblastos ($48,86 \pm 4,5 \text{ N.Ob/B.Pm}$) (Figura 2R), com aumento de osteoclastos/mm ($4,73 \pm 0,56 \text{ N.Oc/B.Pm}$) (Figura 2S) ($p < 0,05$) como visto na coloração por fosfatase ácido tártaro-resistente (TRAP) (Figura 2M) quando comparado a CN ($\text{N.Ob/B.Pm} = 104,1 \pm 22,29$; $\text{N.Oc/B.Pm} = 0,78 \pm 0,29$) (Figura 2L).

O tratamento com o extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. nas doses de 3 e 10 mg/kg não foi capaz de reverter os achados do CP no tecido ósseo alveolar ($p>0,05$). No entanto, o tratamento na dose de 30 mg/kg preveniu a perda óssea ($2,56\pm 0,58 \text{ mm}^2$) quando comparado a CP (Figura 2Q) com preservação do osso alveolar e menor lesão de furca (Figura 2E). Na análise histológica foi possível observar preservação de osso e cemento radicular com menor intensidade do infiltrado inflamatório no grupo (M3)0 (Figura 2J) quando comparado a CP (Tabela 1)

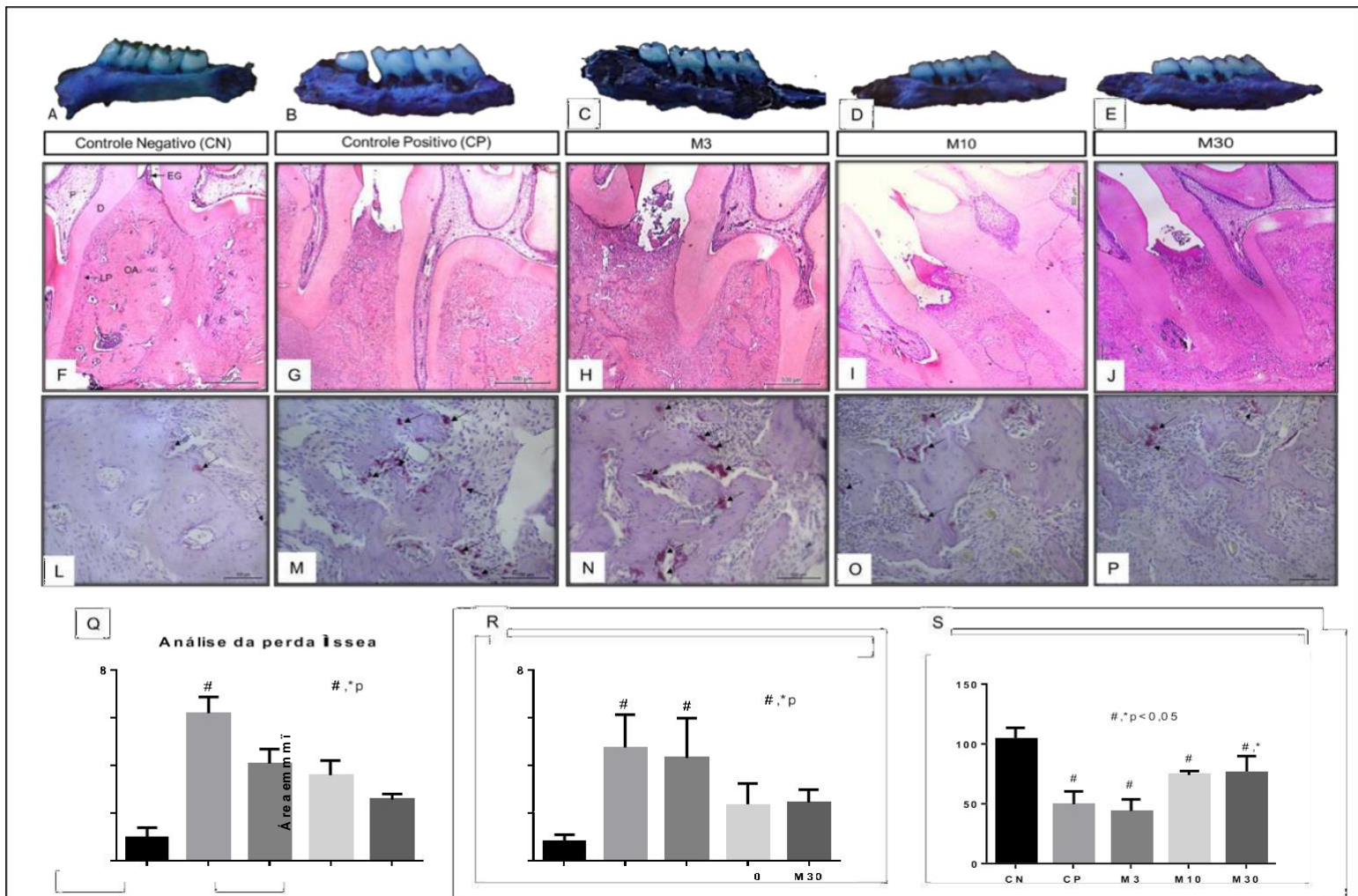


Figura 2. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* reduz perda óssea alveolar. Aspecto macroscópico, histológico e coloração de TRAP da hemimaxila de animais dos grupos: Controle Negativo (A, F, L), Controle Positivo (B, G, M), e tratados com *Chenopodium ambrosioides* nas doses de 3 (C, H, N), 10 (D, I, O) e 30 mg/kg (E, J, P). Análise da perda óssea alveolar (Q); Número de osteoblastos/perímetro ósseo (N.Ob/B.Pm) (R); Número de osteoclastos/perímetro ósseo (N.Oc/B.Pm) (S). Dados representam média \pm E.P.M. de 6 animais por grupo. (*) $p<0,05$ quando comparado a CP. (#) $p<0,05$ quando comparado a CN. (ANOVA seguido de Bonferroni). Magnificação de 40x e 400X. Coloração HE e TRAP. EG=Epitélio gengival, D=Dentina, P=Polpa, LP=Ligamento periodontal, AO=Osso alveolar.

Tabela 1. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* modula o processo inflamatório no periodonto.

	Grupos experimentais					(mg/kg)
	CN	CP	M3	M10	M30	
Escore	0 (0-1)	3 (3-3)#	3(2-3)#	1 (1-2)*	1 (1-2)*	

CN = controle negativo; CP = controle positivo. (#) Indica diferença estatística comparado ao o grupo CN. (*) Indica diferença estatística comparado ao Grupo CP. Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. $P < 0,05$.

3.2. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* não causa danos hepáticos

A figura 3 e a tabela 2 mostram o efeito do extrato de *Chenopodium ambrosioides* sobre o fígado. Os animais do grupo CN não manifestaram qualquer alteração neste órgão, exceto por uma discreta hemorragia sinusoidal (Figura 3B). Nos animais do grupo CP, foi observada moderada congestão da veia porta e da veia centro lobular e discreto edema de hepatócito com moderada hemorragia sinusoidal, porém com ausência de focos inflamatórios (Tabela 2). O tratamento com o extrato na dose de 3mg/kg causou discreta congestão da veia porta e veia centro lobular sem edema de hepatócito, com leve hemorragia sinusoidal e leve presença de focos inflamatórios; ainda, foi possível visualizar leve edema de hepatócito, moderada hemorragia sinusoidal e moderada quantidade de focos inflamatórios (Tabela 2). A dose de 10mg/kg não causou congestão de veia portal e veia centro lobular, mas promoveu discreto edema de hepatócitos e hemorragia sinusoidal sem infiltrado inflamatório (Figura 3B; Tabela 2). Os animais tratados com o extrato hidroalcoólico do mastruz na concentração de 30mg/kg manifestaram discreta congestão da veia portal e da veia centro lobular bem como leve edema de hepatócitos e hemorragia sinusoidal (Figura 3B). Não foi observado diferença estatística na relação peso do órgão/peso do animal entre os diferentes grupos experimentais (Figura 3A).

Tabela 2 Avaliação da toxicidade hepática com uso da *Chenopodium ambrosioides* L. periodontia

Grupos Experimentais (n=6)	Fígado			
	Congestão de veia porta e centro lobular	Edema de hepatócitos	Hemorragia sinusoidal	Presença de focos inflamatórios
CN	0 (0-2)	0 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-0)
CP	2 (1-2)#	1 (0-1)#	2 (1-3)#	0,5 (0-1)
M3	1 (0-1)	0 (0-1)	1,5 (0-2)	1 (1-2)
M10	0 (0-2)*	1 (0-1)	1 (1-1)*	0,5 (0-1)
M30	1 (0-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	0 (0-1)

CN = controle negativo; CP = controle positivo. (#) Indica diferença estatística comparado ao o grupo CN. (*) Indica diferença estatística comparado ao Grupo CP. Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. $P < 0,05$

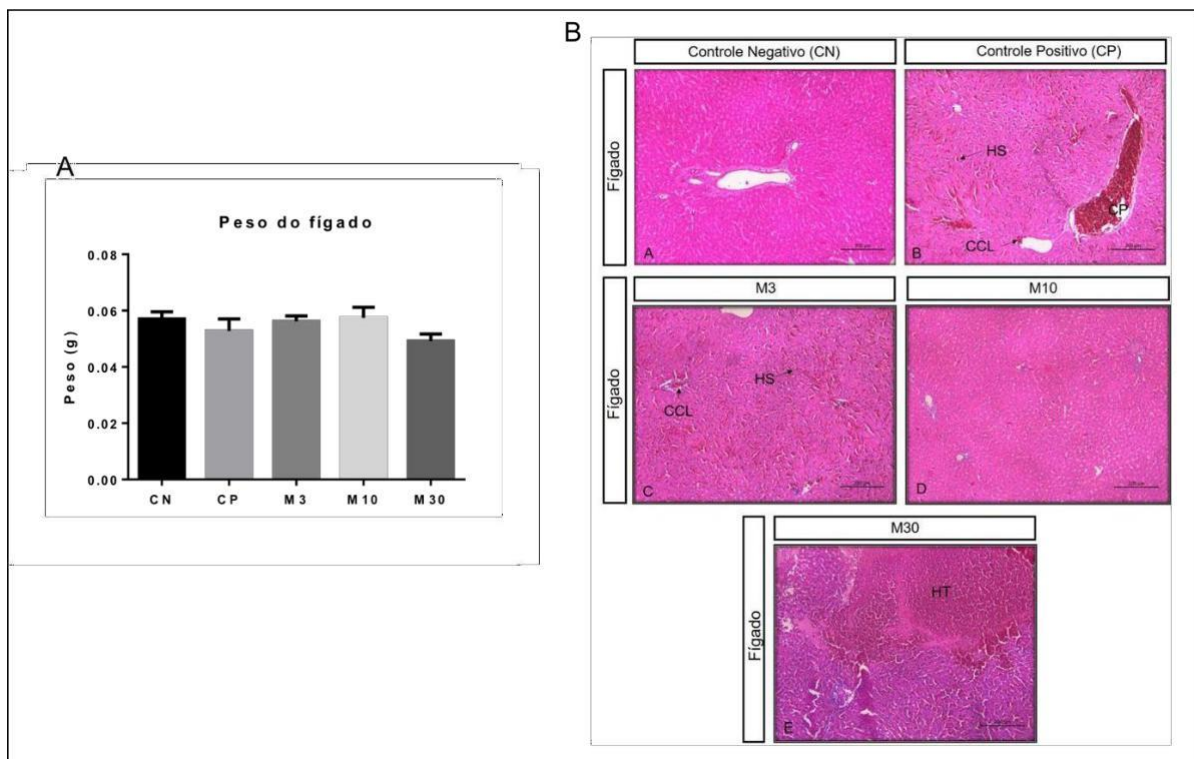


Figura 3. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* não causa danos hepáticos irreversíveis. Peso do fígado (A), Aspecto histológico do fígado (B). Dados representam média±E.P.M. de 6 animais por grupo. (ANOVA seguido de Bonferroni). Magnificação de 4x e 10X. Coloração HE. HS = Hemorragia sinusoidal, CCL =, HT = Hemorragia Tecidual.

3.3. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. não causa danos renais irreversíveis

A figura 4 e a tabela 3 mostram o efeito do extrato de *Chenopodium ambrosioides* sobre os rins. Os animais do grupo CN não apresentavam qualquer alteração renal. (Figura 4B; Tabela 3). Os animais do grupo CP manifestaram um leve edema de células do epitélio tubular, leve vacuolização das células do epitélio tubular, moderada hemorragia intersticial e tubular com ausência de necrose nefrotóxica e perda de

células, contudo pôde ser observado em outros cortes, moderado edema de células do epitélio tubular e vacuolização de células do epitélio tubular e hemorragia intersticial e tubular com moderada perdas de células. Outro aspecto que esteve presente nesse grupo presença de cilindro hialino focal (Figura 4B; Tabela 3). Os animais que foram tratados na dose de 3 mg/kg apresentaram edema e vacuolização de células do epitélio tubular de intensidades leve a moderada. Foi observado, ainda, hemorragia intersticial e tubular leve a moderada com lâminas sem perda de células de intensidade leve a moderada. A presença de cilindro hialino focal também foi observada (Figura 4B; Tabela 2). Na dose de 10mg/kg houve edema de células do epitélio tubular e vacuolização do epitélio tubular de intensidade leve a moderada bem como a hemorragia intersticial tubular de intensidade leve a moderada com perdas de células que variavam em intensidade de ausente a moderada. Foi observado a presença de cilindro hialino focal (Figura 4B; Tabela 2). Na dose de 30 mg/kg foi possível verificar edema de células do epitélio tubular de leve a moderado, vacuolização de células do epitélio tubular e hemorragia intersticial e tubular recorrentes e com perda de células que variaram de ausente a leve. Foi observado a presença de cilindro hialino focal (Figura 4B; Tabela 2). Não foi observado diferença estatística quando comparando a relação peso do órgão/peso do animal entre os grupos experimentais (Figura 4A).

Tabela 3. Avaliação da toxicidade renal com uso da *Chenopodium ambrosioides* L. periodontia

Grupos Experimentais (n=6)	Rim				
	Edema de células do epitélio tubular	Vacuolização de células do epitélio tubular	Hemorragia intesticial e tubular recente	Necrose nefrotóxica	Perda de células
CN	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-1)
CP	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-2)	0 (0-0)	0 (0-2)
M3	1,5 (1-2)	1,5 (1-2)#	1 (1-2)	0 (0-0)	0 (0-2)
M10	1 (1-2)	1 (1-2)	1,5 (1-2)	0 (0-0)	1 (0-2)
M30	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	0 (0-0)	1 (0-1)

CN = controle negativo; CP = controle positivo. (#) Indica diferença quando estatística comparado ao o grupo CN. Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. $P < 0,05$

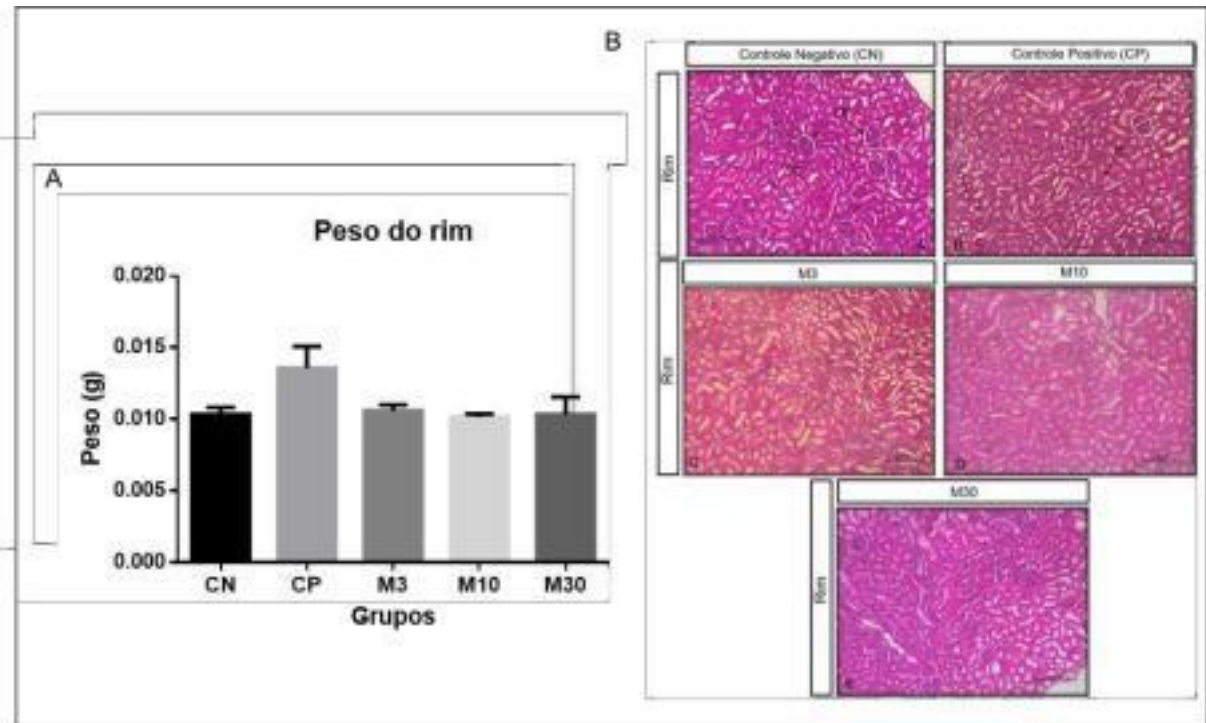


Figura 4. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* não causa danos renais. Peso dos rins (A), Aspecto histológico do rim (B). Dados representam média±E.P.M. de 6 animais por grupo. (*) $p < 0,05$ quando comparado a CP. (#) $p < 0,05$ quando comparado a CN (ANOVA seguido de Bonferroni). Magnificação de 4x e 10X. Coloração HE. TC = Túbulo Contorcido, CR = Corpúsculo Renal, HI = Hemorragia Intersticial.

3.4. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. não causa danos gástricos irreversíveis.

A figura 5 e a tabela 4 mostram o efeito do extrato de *Chenopodium ambrosioides* sobre o estômago. Os animais do grupo CN não sofreram qualquer alteração no padrão histológico deste órgão (Figura 5B). A região de cárdia dos animais pertencentes ao grupo CP apresentou uma variação de ausência a leve presença de vasos ectásicos e ausência de hemorragia. A região de fundo apresentou glândulas mucosas gástricas visíveis, ausência de hemorragia, leve edema tecidual, leve presença de vasos ectásicos com perdas de células que variaram de ausente a moderada (Figura 5B).

Os animais que receberam a dose de 3 mg/kg do extrato apresentaram na região de cárdia ausência de vasos ectásicos e hemorragia. Na região de fundo foi possível observar a presença das glândulas da mucosa gástrica, presença de vasos ectásicos ausência de hemorragia, infiltrado inflamatório de intensidade leve a moderada com edema tecidual de intensidade leve a moderada e leve perda de células (Figura 5B). Na dose de 10 mg/kg, na região de cárdia, houve leve presença de vasos ectásicos com ausência de hemorragia. Na região de fundo as glândulas da mucosa gástrica

estavam presentes com vasos ectásicos variando quanto a intensidade de ausente a leve bem como infiltrado inflamatório e perda de células variando de intensidade leve a ausente. O edema tecidual estava presente em todos os animais e variou quanto a intensidade de leve a moderado (Figura 5B). Os animais que receberam o extrato na dose de 30 mg/kg apresentaram na região de cárdia vasos ectásicos variando de intensidade leve a ausente sem hemorragia evidente. Na região de fundo as glândulas mucosas eram visíveis e em todos os animais continham vasos ectásicos mas sem hemorragia visível. O infiltrado inflamatório e edema variaram quanto a intensidade de leve a ausente com perda de células variando quanto a intensidade de moderada a ausente (Figura 5B). Não foi observado diferença estatística quando comparando a relação peso do órgão/peso do animal entre os grupos experimentais (Figura 5A).

Tabela 3. Avaliação da toxicidade no estômago com uso da *Chenopodium ambrosioides* L. periodontia

Grupos Experimentais (n=6)	Estômago							
	Cárdia			Fundo				
	Presença de vasos ectásicos	Hemorragia	Presença de glândulas de mucosa gástricas	Presença de vasos ectásicos	Hemorragia	Presença de infiltrados inflamatórios	Perda de células	Edema
CN	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
CP	0,5 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)	0 (0-0)	1 (0-1)	1,5 (0-2)	1 (0-1)
M3	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)	0 (0-0)	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (1-2) [#]
M10	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)	0 (0-0)	1 (0-1)	1 (0-1)	1 (1-2) [#]
M30	1 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-0)	1 (0-1)	0,5 (0-2)	1 (0-1)

CN = controle negativo; CP = controle positivo. (#) Indica diferença estatística quando comparado ao o grupo CN. Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. $P < 0,05$.

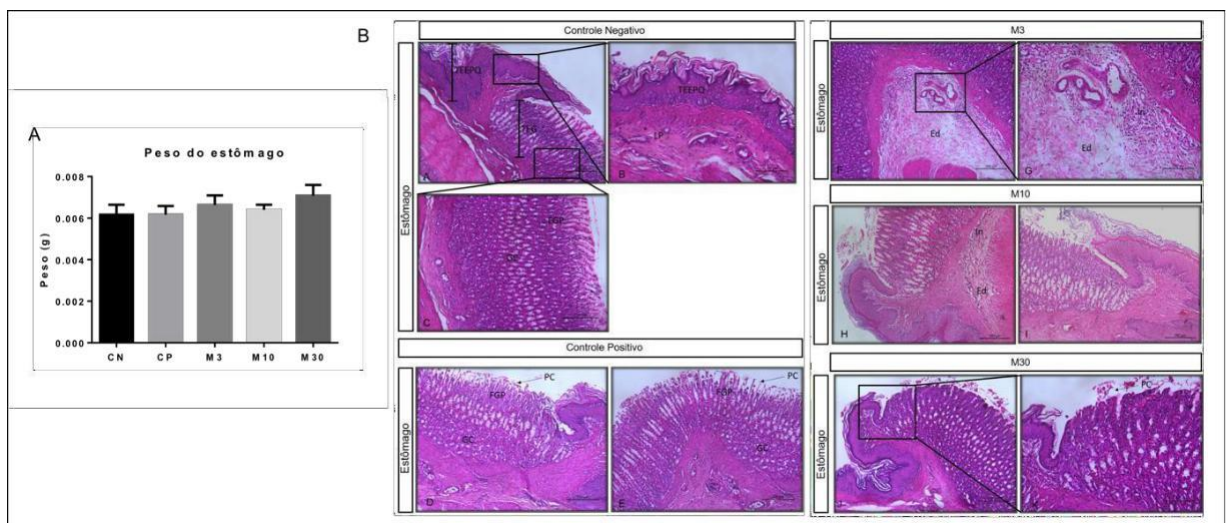


Figura 5. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* não causa danos gástricos. Peso do estômago (A), Aspecto histológico do estômago (B). Dados representam média±E.P.M. de 6 animais por grupo. (ANOVA seguido de Bonferroni). Magnificação de 4 e 10X Coloração HE. **TEEPQ**=Tecido Epitelial Estratificado Pavimentoso Queratinizado, **TEG**=Tecido Epitelial Glandular, **LP**=lâmina Própria, **FGP**=Fossetas Gástricas Profundas, **GC**=Glândulas Curtas, **PC**=Perda Celular, **ED**=Edema, **In**=Infiltrado inflamatório.

3.5 Variação da massa corpórea dos animais durante o experimento

Os pesos foram registrados diariamente a partir do dia da indução da periodontite até o dia da eutanásia. Os animais que foram submetidos a periodontite tiveram uma variação de massa corpórea negativa no segundo dia devido ao procedimento de indução da doença periodontal. Até o 7^o dia todos os animais ganharam peso e os animais dos grupos M3 e M10 apresentaram maior perda de peso até o dia da eutanásia no 11^o dia (Figura 6A e 6B). Contudo todas as variações de peso, dia após dia, comparando entre os grupos CP, M3, M10 e M30 com o CN foi possível verificar diferença estatística apenas no segundo dia ($p=0,0002$; $p=0,0013$; $p=0,0007$; $p<0,0001$; respectivamente).

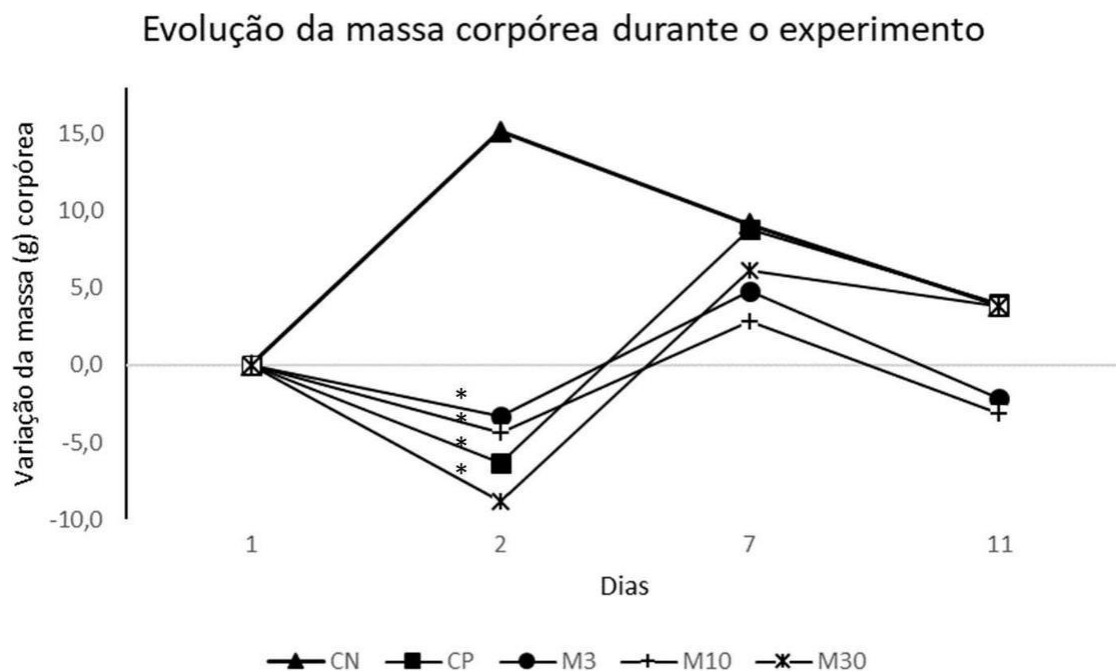


Figura 6. O extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. não afetou o ganho de peso nos animais. Dados representam média±E.P.M. (n=6) ($p<0,05$) (ANOVA seguido de Bonferroni).

4. DISCUSSÃO

As práticas de eliminação do biofilme pelo paciente e pelo profissional (raspagem e alisamento corono-radicular) são essenciais para o controle da inflamação periodontal (SANCHEZ et al., 2020). Os agentes antioxidantes de origem vegetal vêm ganhando destaque como adjuvantes no tratamento da doença periodontal por diminuírem a inflamação no tecido afetado (CASTRO et al., 2019).

A doença periodontal estimula a liberação de mediadores pró-inflamatórios no tecido periodontal como as interleucinas IL-1 e TNF- α , por exemplo, que ativam os osteoclastos resultando em perda óssea. Nesse experimento o grupo CP apresentou um aumento estatisticamente significativo para a reabsorção óssea e severa reabsorção óssea alveolar, severa absorção de cimento e intenso infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica comparado ao grupo CN mostrando, assim, que a doença periodontal foi induzida com sucesso nesse experimento.

O extrato bruto hidroalcoólico da folha da *Chenopodium ambrosioides* L. administrado na concentração de 30mg/kg diminuiu, de forma estatisticamente significativa, o efeito absortivo causado pela doença periodontal, aumentou onúmero de osteoblastos e diminuiu o número de osteoclasto por perímetro de osso alveolar entre o primeiro e segundo molar.

Os efeitos anti-inflamatórios da *Chenopodium ambrosioides* L. são causados pela presença de flavonoides em sua composição, metabólitos secundários mais presente nos vegetais. Eles pertencem a classe dos polifenóis e são subclassificados como chalconas, flavonas, flavanonóis, flavanonas, isoflavonsa, flavon-3-ols e antocianidinas (CANO et al., 2016).

O extrato bruto hidroalcoólico usado nessa pesquisa apresentou como flavonoide majoritário a Rutina, também conhecida como Vitamina P, que segundo Manach et al. (1997) e Walle et al. (2004), quando ingerida por via oral, é completamente hidrolisada por glicosidades produzidas pelas enterobactérias dando origem a Quercetina 3-glicosídica e Quercetina aglicona. Quando absovidos pelo intestino são conjugados no fígado tornando assim um metabólito mais ativo (BECHO et al., 2009). Desta forma, seus efeitos anti-inflamatórios acontecem devido a quercetina resultante da biotransformação no intestino.

Os flavonoides, dentre eles a quercetina, possuem efeitos direto no metabolismo ósseo agindo na diminuição da reabsorção óssea pela diminuição da quantidade de osteoclasto e promovendo a diferenciação de pré-osteoblastos (RIOS et al., 2017).

Kamel et al., (2003), concluíram, no estudo *in vitro*, que os polifenóis presente na *Chenopodium ambrosioides* L., são os responsáveis por interferir diretamente no

tempo de vida dos osteoclastos induzindo uma diminuição nos processos de reabsorção óssea, devido a apoptose dessas células, e a diferenciação de osteoclastos (KAMEL et al., 2003; LEE et al., 2005).

Nesse trabalho, foi observado por atividade da Fosfatase Ácido Resistente ao Tartarato (TRAP) que houve uma diminuição do número de osteoclasto por milímetro de osso quando administrado o extrato na concentração de 30mg/kg. Essa diminuição do número de osteoclasto se deve ao fato da Rutina, totalmente biotransformada no intestino em quercetina, provavelmente atuar diminuindo a quantidade de RANKL no tecido por inativação de linfócitos TH17 (KIM et al., 2018).

A rutina é capaz de ativar genes de transcrição específicos para osteogênese como o RUNX2 e potencializar a ação da fosfatase alcalina óssea, o que pode justificar o aumento da quantidade de osteoblasto nos animais que receberam o extrato na concentração de 30mg/kg nessa pesquisa (ZHAO, 2020).

Esses achados são confirmados pelos resultados obtidos nos aspectos histopatológicos em hematoxilina e eosina uma vez que foi possível observar que os padrões de reabsorção do cimento, do osso alveolar bem como a presença do infiltrado inflamatório provocada pela periodontite melhoram na administração da dose de 30 mg/kg. Confirmando a rutina como um agente anti-inflamatório.

Desta forma a *Chenopodium ambrosioides* L., apresenta-se como alternativa adjuvante no tratamento da doença periodontal uma vez que o seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo já mostrou ser capaz de melhorar os padrões inflamatórios da doença periodontal devido a presença de flavonoides em sua composição.

A administração via oral diária (dose única) do extrato melhorou o padrão de reabsorção óssea na periodontite e não foi capaz de provocar efeitos tóxicos teciduais no estômago, rim e fígado. De maneira geral, as avaliações histológicas para toxicidade avaliam sinais de lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue, perda de células.

Alguns estudos já concluíram que o modelo de periodontite experimental induzidos por ligadura causam danos hepáticos (MESTER et al., 2019; HAN et al.,

2016 e TOMOFUGI et. al., 2008). No presente estudo foi possível constatar que o grupo CP apresentou resultados estatisticamente significativos para congestão vascular da veia porta, edema de hepatócito e hemorragia sinusoidal quando comparado ao grupo CN, corroborando assim os resultados encontrados por aqueles autores.

As estruturas periodontais produzem citocinas pró-inflamatórias e bactérias presente no biofilme são translocadas para a circulação sanguínea até chegar ao fígado. Os leucócitos polimorfonucleares ativados produzem Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) causando estresse oxidativo no tecido promovendo alterações hepáticas (MESTER, et al., 2019).

Mendoza et al., (2013), investigando a hepatotoxicidade gerada pela a ingestão do extrato hidroalcoólico do mastruz, observou que o fígado apresentava aspectos de distúrbios hemodinâmicos inespecíficos (congestão da veia porta hepática, por exemplo) em animais tratados e não tratados com a infusão do mastruz. Esse resultado foi semelhante ao encontrado nessa pesquisa onde maioria dos animais de todos os grupos demonstraram padrões de congestão vascular. O autor ainda afirma que se estes aspectos de congestão vascular estiverem sendo evidenciados de forma isolada sem nenhuma outra característica de lesão hepática, não se pode dizer que essas alterações vasculares podem estar sendo causadas por toxicidade química. Por esse motivo, o aspecto para o edema de hepatócito, hemorragia sinusoidal, edema tecidual e presença de focos inflamatórios e peso dos órgãos foram também investigados nesta pesquisa.

Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram, pela primeira vez, o uso do extrato hidroalcoólico da folha da *Chenopodium ambrosioides* L., administrado via oral, como uma alternativa adjuvante no tratamento da periodontite. Além disso, mostramos que o tratamento com o extrato da planta na concentração de 30mg/kg foi capaz de diminuir a reabsorção óssea em 41,3%, aumentou o número de osteoblasto por milímetro de osso em 24,7% e diminuiu 51,3% a quantidade de osteoclasto por milímetro de osso quando comparado ao grupo CP. A ação antirreabsortiva da planta foi confirmada pela análise histopatológica com a diminuição em intensidade dos padrões de reabsorção de osso alveolar, cemento e infiltrado inflamatório no grupo que recebeu o extrato na concentração de 30mg/kg. Assim, o extrato da folha da

Chenopodium ambrosioides L. exerceu efeito antirreabsortivo ósseo na periodontite experimental com baixo potencial tóxico para o fígado, rim e estômago.

Visto que foi possível verificar a participação da *Chenopodium ambrosioides* L. no metabolismo ósseo associado a doença periodontal é necessário novos estudos para entender como acontece a participação da rutina, flavonoide majoritário do extrato testado, nas vias de sinalização do metabolismo ósseo e quantificação de interleucinas pró-inflamatória e anti-inflamatórias envolvidas na patogênese da doença.

5. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica do extrato da folha da *Chenopodium ambrosioides* L. mostrou que a rutina foi o flavonoide majoritário. O tratamento com a o extrato da planta na dose de 30mg/kg reduziu a perda óssea alveolar com aumento na quantidade de osteoblasto e diminuição de osteoclasto por perímetro ósseo apresentando baixa toxicidade tecidual para o fígado, estômago e rim.

6. REFERÊNCIAS

Steffens J.P., Marcantonio R.A.C. (2018) Classification of Periodontal and Periimplantar Diseases and Conditions: a Practical Guide and Key Points. Ver Odontol UNESP, 47(4):189-197.

Cruz J.H.A., Ferreira J.L.S., Simões A.P.G., Cristino D.L., Costa E.I.D., Souza E.R.L., Dantas I.A.O., Ramos L.L., Gomes N.M.L., Silva R.L.B., Oliveira Filho A.A.. (2018) *Malva Sylvestris, Vitis Vinífera and Punica Granatum*: a review of the contribution to the treatment periodontitis. Arch Health Invest, 7(11):486-491.

Lins D.A.U.L., Pequeno M.T., Melo J.P.L.C., Ferreira R.C.Q., Silveira E.J.D., Dantas E.M.D. (2007) Bone Resorption in Periodontal Disease: the Role of Cytokines and Prostaglandins. Ver. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac, 7(2):29-36.

Sanchez I.S., Montero E., Citterio F., Romano F., Molina A., Aimetti M. (2020) Efficacy of access flap procedures compared to subgingival debridement in the treatment of periodontitis. A systematic review and meta-analysis, 1-7.

Castro M.M.L., Duarte N.N., Nascimento P.C., Magno M.B., Fagundes N.C.F., Mir C.F., Monteiro M.C., Rösing C.K., Maia L.C., Lima R.R. (2019) Antioxidants as Adjuvants in Periodontitis Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1-24.

Degenhardt R.T., Farias I.V., Grassi L.T., Franchi Jr. G.C., Nowill A.E., Bittencourt C.M.S., Wagner T.M., Sousa M.M., Cruz A.B., Malheiros A. (2016) Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 56-61.

Rios C.E., Abreu A.G., Braga Filho J.Á., Nascimento J.R., Guerra R.N., Amaral F.M., Maciel M.C., Nascimento F.R. (2017) *Chenopodium ambrosioides* L. Improves Phagocytic Activity and Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. Front Microbiol, 8:1-7.

Kilkenny C., Browne W., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G. (2010) Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines, 160:1577-1579.

Silva M.G.C., Amorim N.L., Câmara C.C., Neto J.D.F., Blanco B.S. (2014) Acute and Sub-Chronic Toxicity of Aqueous Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Leaves in Rats. *Journal of medicinal food*, 1-6.

Lima V., Vidal F.D.P., Rocha F.A.C., Brito G.A.C., Ribeiro R.A. (2004) Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats, 75(1):162-168.

Patrício F.J., Costa G.C., Pereira P.V.S., Aragão-Filho W.C., Sousa S.M., Frazão J.B., Pereira W.S., Maciel M.C.G., Silva L.A., Amaral F.M.M., Rebêlo J.M.M., Guerra R.N.M., Ribeiro M.N.S., Nascimento F.R.F. (2008) Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonenses*. *Journal of ethnopharmacology*, 115:313-319.

Assaidi A., Legssyer A., Berrichi A., Aziz M., Mekhfi H., Bnouham M., Ziyat A. (2004) Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. *J Complement Integr Med*, 11(1);1-7.

Calado G.P., Lopes A.J.O., Costa Junior L.M., Lima F.C.A., Silva L.A., Pereira W.S. *Chenopodium ambrosioides* L. (2015) Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. *PLoS ONE*, 10(11):1-18.

Goes P., Lima A.P.S., Melo I.M., Rêgo R.O.C.C., Lima V. (2010) Effect of Atorvastatin in Radiographic Density on Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Braz Dent J*, 21(3):193-198.

Goes P., Melo I.M., Dutra C.S., Lima A.P.S., Lima V. (2012) Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Archives of biology*, 57:1537-15-54.

Leitão R.F.C., Ribeiro R.A., Chaves H.V., Rocha F.A.C., Lima V., Brito G.A.C. (2005) Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*, 76(6):956-963.

Goes P., Dutra C., Lösser L., Houfbauer L.C., Rauner M., Thiele S. (2019) Loss of Dkk-1 in osteocytes mitigates alveolar bone loss in mice with periodontitis. *Front. Immunol*, 10:1-8.

Ribeiro K.A., Chaves H.V., Filho S.M.P., Pinto I.R., Monteiro D.A.M., Matos S.O., Gadelha T.S., Gadelha C.A.A., Lacerda J.T.J.G., Aguiar L.M.V., Pereira K.M.A., Benevides N.M.B., Pinto V.P.T., Filho G.C.F., Bezerra M.M., Silva A.A.R. (2015) Alpha-2 Adrenergic and Opioids Receptors Participation in Mice Gastroprotection of *Abelmoschus esculentus* Lectin, (22):1-7.

Pinto I.R., Chaves H.V., Vasconcelos A.S., Sousa F.C.F., Gadelha T.S., Lacerda J.T.J.G., Ribeiro K.A., Freitas R.S., Maciel L.M., Filho S.M.P., Viana A.F.S.C., Gadelha C.A.A., Filho G.C., Pinto V.T.P., Pereira K.M.A., Rodrigues A.A., Bezerra M.M. (2019) Antiulcer and Antioxidant Activity of a Lectin from *Mucuna pruriens* Seeds on Ethanol- induced Gastropathy: Involvement of Alpha-2 Adrenoceptors and Prostaglandins. *Curr Pharm Des*, 25(12):1430-1439.

Cano F.J.P., Castell M. (2016) Flavonoids, inflammations and immune system. *Nutrients*, 8:659.

Manach C., Morand C., Demigné C., Texier O., Régéat F., Rémésy C. (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters*, 409:12-16.

Walle T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7):829-837.

Becho J.R.M, Machado H., Guerra M.O. (2009) Rutin-structure, metabolism and pharmacological potency. *Ver. Inter. Estud. Experimental*, 1(1):21-25.

Kamel S., Wattel A., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit J.P., Fardelonne P., Brazier M. (2003) Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin

and kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, 65:35-42.

Lee N.K., Choi Y.G., Baik J.Y., Han S.Y., Jeong D, Bae Y.S., Kim N., Lee Y. (2005) A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, 106(3):852-859.

Kim H.R., Kim B.M., Won J.Y., Lee K.A., Ko H.M., Kang Y.S., Lee S.H., Kim K.W. (2018) Quercetin, a Plant Polyphenol, Has Potential for the Prevention of Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. *J med Food*, 22(2):1-10.

Zhao B., Zhang W., Xiong Y., Zhang Y., Jia L., Xu X. (2020) Rutin protects human periodontal ligament stem cells from TNF- α induced damage to osteogenic differentiation through suppressing mTOR signaling pathway in inflammatory environment. *Arch Oral Biol*, 109.

Mester A., Ciobanu L., Marian T., Apostu D., Lucaciu O., Filip A., Feldrihan V., Licerete E., Ilea K., Ilea A., Piciu A., Dan O. (2019) Periodontal disease may induce liver fibrosis in an experimental study on wistar rats, 90(8):911-919.

Han P., Sun D., Yng J. (2016) Interaction between periodontitis and liver diseases (review), (5); 267-276.

Tomofugi T., Sanbe T., Ekuni D., Azuma T., Irie K., Maruyama T., Tamaki N., Yamamoto T. (2008) Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. *Archives of oral biology*, 53:1113-1118.

Mendoza M.A.M., Palacios E.A.P., Valencia J.G.M.V., Madrid P.A.E. (2013) Subchronic toxicology of *Chenopodium ambrosioides* (epazote) infusion orally administered to NIH mice. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1):157-170.

Sousa L.H., Moura E.V., Queiroz A.L., Val D, Chaves H., Lisboa M., Furlaneto F., Brito G.A., Goes P. (2017) Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 77:55-61.

7. ANEXO I

Certificado de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal da pesquisa



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORPTIVO ÓSSEO DA CHENOPODIUM AMBROSIODES L. EM RATOS SUBMETIDOS A PERIODONTITE EXPERIMENTAL”, protocolo 149/17, sob responsabilidade da Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 12 de dezembro de 2017.

Vigência do projeto	01/01/2018 à 01/01/2020
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de Animais	60
Peso	200 – 250 g
Sexo	Macho
,Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 13 de dezembro de 2017.


 Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador da CEUA UFC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666882

Conclusão geral

4. CONCLUSÃO GERAL

A análise fitoquímica do extrato da folha da *Chenopodium ambrosioides* L. mostrou que a rutina foi o flavonóide majoritário. O tratamento com a o extrato da planta na dose de 30mg/kg mostrou efeito protetor no tecido ósseo com aumento na quantidade de osteoblasto e diminuição de osteoclasto por perímetro ósseo sem causar danos irreversíveis aos tecidos do fígado, estômago e rim.

5. REFERÊNCIAS

Steffens J.P, Marcantonio R.A.C Classification of Periodontal and Periimplantar Diseases and Conditions: a Practical Guide and Key Points. Ver Odontol UNESP. 2018;47(4):189-197

SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.

Cruz JHA, Ferreira JLS, Simões APG, Cristino DL, Costa EID, Souza ERL, Dantas IAO, Ramos LL, Gomes NML, Silva RLB, Oliveira Filho AA. *Malva Sylvestris, Vitis Vinífera and Punica Granatum*: a review of the contribution to the treatment periodontitis. Arch Health Invest. 2018;7(11):486-491

Lins DAUL, Pequeno MT, Melo JPLC, Ferreira RCQ, Silveira EJD, Dantas EMD. Bone Resorption in Periodontal Disease: the Role of Cytokines and Prostaglandins. Ver. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac. 2007;7(2):29-36

Sanchez I.S., Montero E., Citterio F., Romano F., Molina A., Aimetti M. (2020) Efficacy of access flap procedures compared to subgingival debridement in the treatment of periodontitis. A systematic review and meta-analysis, 1-7.

Castro M.M.L., Duarte N.N., Nascimento P.C., Magno M.B., Fagundes N.C.F., Mir C.F., Monteiro M.C., Rösing C.K., Maia L.C., Lima R.R. (2019) Antioxidants as Adjuvants in Periodontitis Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1-24.

Degenhardt RT, Farias IV, Grassi LT, Franchi Jr. GC, Nowill AE, Bittencourt CMS, Wagner TM, Sousa MM, Cruz AB, Malheiros A. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2016;56-61

Rios CE, Abreu AG, Braga Filho JÁ, Nascimento JR, Guerra RN, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR. *Chenopodium ambrosioides* L. Improves Phagocytic Activity and Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. Front Microbiol. 2017;8:1-7

Oliveira LSS, Ferreira FS, Barroso AM. Herb Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.): Clinical applications and toxic forms – A review. Jornal Brasileiro de Ciência Animal. 2014;7(13):464-499

Calado GP, Lopes AJO, Costa Junior LM, Lima FdCA, Silva LA, Pereira WS. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. PloS ONE. 2015;10(11):1-18

Silva MGC, Amorim NL, Câmara CC, Neto JDF, Blanco BS. Acute and Sub-Chronic Toxicity of Aqueous Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Leaves in Rats. Journal of medicinal food. 2014;1-6

Neto VFP, Ribeiro RM, Morais CS, Mateus, *Chenopodium ambrosioides* as a bone graft substitute in rabbits radius fracture. 2017;17-350

Soares CD, Carvalho GFD, Carvalho RA, Trindade SRPT, Rego ACM, Filho IA, Marques MM. *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. Acta Cirúrgica Brasileira. 2015;30(12):812-818

Cano F.J.P., Castell M. (2016) Flavonoids, inflammations and immune system. Nutrients, 8:659.

Zago PMW, Branco SJSCB, Fecury LAB, Carvalho LT, Rocha CQ, Madeira PLB, Sousa EM. Anti-biofilm Action of *Chenopodium ambrosioides* Extract, Cytotoxic Potential and Effects on Acrylic Denture Surface. Front Microbiol. 2019;10:1724-1733

Rios CE, Abreu AG, Braga Filho JÁ, Nascimento JR, Guerra RN, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR. *Chenopodium ambrosioides* L. Improves Phagocytic Activity and Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. Front Microbiol. 2017;8:1-7

Nowak R, Szewczyk K, Dziki UG, Rzymowska J, Komsta L. Antioxidative and cytotoxic potential of some *Chenopodium* L. species growing in Poland. Saudi Journal of Biological Sciences. 2016;23:15-23

Gohar AA, Elmazar MMA. Isolation of Hypotensive Flavonoids from *Chenopodium* Species Growing in Egypt. 1997;11:564-567

Jain N, Alam MS, Kamil M, Ilyas M, Sakae A. Two flavonol glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. Phytochemistry. 1990;3988-3991

*Normas para
publicação*

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print

(approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.

3. Letters to the Editors.

4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.

Outlines for potential reviews need to include:

- A detailed abstract using the structure provided in the guidelines
- An annotated table of contents
- A short CV of the lead author

5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.

6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

Submission checklist

Please click [here](#) to download the Submission **Checklist**. This is a mandatory file during submission. Upload the completed checklist and choose the file type as "Checklist".

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords

- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Author contributions

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see ['Multiple, redundant or concurrent publication'](#) for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). [Sharing](#) your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see ['Multiple, redundant or concurrent publication'](#) for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author

names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the

research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards. S., Moerman. D.E.. and Leonti. M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.



Preparation

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not

just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was

done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings** *Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions*.

Click [here](#) to see an example.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with <http://www.theplantlist.org> mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artworj

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to

a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003).

Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of

publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)....

Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide

text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*.

Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).