

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS -
PPGCAM**

**Identificação de flavonoides por LC-MS/MS no extrato de folhas da
Trattinnickia rhoifolia (Willd) e avaliação da atividade antioxidante**

LILIAN MARIGO MAGALHÃES

Sinop – Mato Grosso

Fevereiro, 2017

LILIAN MARIGO MAGALHÃES

**Identificação de flavonoides por LC-MS/MS no extrato de folhas da
Trattinnickia rhoifolia (Willd) e avaliação da atividade antioxidante**

Orientador: Prof. Dr. Adilson Paulo Sinhorin

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin

Dissertação apresentada ao PPGCAM como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Bioprospecção.

Sinop – Mato Grosso

Fevereiro, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M335i Marigo Magalhães, Lilian.

Identificação de flavonoides por LC-MS/MS no extrato de folhas da *Trattinnickia rhoifolia* (Willd) e avaliação da atividade antioxidante / Lilian Marigo Magalhães. -- 2017

xi, 28 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Adilson Paulo Sinhorin.

Co-orientadora: Valéria Dornelles Gindri Sinhorin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Sinop, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Trattinnickia rhoifolia*. 2. Compostos fenólicos. 3. Flavonoides. 4. Antioxidante. 5. Hepatotoxicidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCACÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
 PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
 Avenida Alexandre Ferronato, nº 1.200 - Setor Industrial - Cep: 78557267 - Sinop/MT
 Tel : 66 3531-1663/r. 206 - Email : ppgcam@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Identificação de flavonóides por LC-MS/MS no extrato de folhas da *Trattinnickia rhoifolia* (Willd) e avaliação da atividade antioxidante"

AUTOR : Mestranda LILIAN MARIGO MAGALHÃES

Lilian Marigo Magalhães

Dissertação defendida e aprovada em 23/02/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutor(a) Adilson Paulo Sinhorin
 Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Adilson

Examinador Interno Doutor(a) LINDSEY CASTOLDI
 Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Lindsey Castoldi

Examinador Interno Doutor(a) Marina Mariko Sugui
 Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Marina Mariko Sugui

Examinador Externo Doutor(a) Rogério de Campos Bicudo
 Instituição : Embrapa Agrossilvopastoril

Rogério de Campos Bicudo

Examinador Suplente Doutor(a) Rodrigo Chelegão
 Instituição : Embrapa Agrossilvopastoril

Examinador Suplente Doutor(a) Carla Regina Andrichetti Fröhner
 Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

SINOP,23/02/2017.

Sinopse:

Determinou-se a concentração dos compostos fenólicos e flavonoides totais, o potencial antioxidante, a identificação dos flavonoides por LC-MS/MS e atividade biológica das frações hidrometanólica e acetato de etila a partir do extrato bruto etanólico das folhas do espécime *Trattinnickia rhoifolia*.

Palavras-chave: Plantas medicinais, metabólitos secundários, radicais livres, hepatotoxicidade.

Dedico este trabalho ao meu esposo
João Carlos Magalhães pelo carinho, incentivo,
paciência e apoio em todos os momentos. Te Amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por permitir que tudo isso acontecesse me dando força em todas as dificuldades e principalmente pelas maravilhosas pessoas que colocou em meu caminho para que esse sonho fosse realizado.

A meu marido João Carlos Magalhães e filhos João Pedro e João Gabriel razões da minha alegria e vontade de viver. A meu pai Marco Antonio Marigo pelo apoio e em especial minha mãe Ana Maria Bertolacini Rodrigues Marigo por vir de longe, deixar sua casa para me ajudar, se preocupar comigo e sempre me incentivar nos estudos. Agradeço a minha sogra Clea Nazaré Torres Magalhães que doou seu tempo cuidando da minha família para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Ao professor e orientador Dr. Adilson Paulo Sinhorin pela oportunidade, por me aceitar como sua aluna, pela paciência, ensinamentos e pelo exemplo de professor, obrigada por tornar possível essa conquista.

A professora e coorientadora Dr^a. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin, por colaborar comigo, pela atenção, disposição de ajudar e ensinar, pela confiança e compreensão nas diversas situações cotidianas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop, juntamente com seus professores permanentes e colaboradores.

Meu obrigado aos colegas da turma de 2015, em especial as amigas Camila Cristina Pereira de Souza, pelas longas jornadas de trabalho e pelo companheirismo, Juliana Brasil Riefel pelas conversas e na elaboração de trabalhos, Naiéle Sartori Patias pela ajuda no laboratório e no desenvolvimento da pesquisa, aos amigos Fernando Gomes e Fernando Rafael Moura por toda ajuda.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para que esse mestrado se tornasse realidade, e que todos os objetivos fossem cumpridos. Em particular a Ana Paula Simões da Cunha, Ritane Lima, Débora Linsbinski Pereira, Aline Gemelli, Tatiane Cordeiro, Thaniara Barbosa da Costa, Romeu José da Costa, Jaqueline Kerkoff, a ajuda de vocês foi essencial para a realização desse trabalho. A Edith Eunice Arthur Petrica que por telefone e email colaborou dando dicas e transmitindo suas experiências.

Agradeço ao colégio Regina Pacis, diretores, coordenadores e professores do colégio que me substituíram e me deram suporte nas ausências ou troca de aulas.

A EMBRAPA Agrossilvipastoril Sinop-MT, pelo suporte nas análises e ao funcionário e amigo Rogério de Campos Bicudo pela ajuda intelectual, por dispensar seu tempo e paciência para que esse trabalho seja um sucesso.

Aos membros da banca de qualificação Dr^a. Marina Mariko Sugui, Dr^a. Carla Regina Andriguetti e Dr^a. Lindsey Castoldi meu muito obrigado pelas sugestões para a melhoria do meu trabalho.

Agradeço a agência de financiamento FAPEMAT pelo apoio à pesquisa.

RESUMO

A *Trattinickia rhoifolia* é uma planta de uso medicinal utilizada popularmente para tratar doenças de garganta, lacerções de pele, tratamento e prevenção de tumores e leucemia. O estudo refere-se ao isolamento de compostos fenólicos, avaliação da atividade biológica em camundongos e da capacidade sequestradora de radicais livres nos extratos das folhas dessa planta. As folhas foram coletadas no município de Sinop/MT, secas em estufa, trituradas e submetidas à extração dos constituintes químicos com etanol. O extrato bruto etanólico foi submetido a uma partição que originou as frações hidrometanólica (HM) e acetato de etila (EA). As análises químicas de fenóis totais foram feitas pelo método de Folin-Ciocalteau, os flavonoides totais pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio e o potencial antioxidante realizado pelo método de redução do radical DPPH• em concentração eficiente para reduzir 50% da atividade (EC_{50}). Os flavonoides identificados por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS/MS). Para análises biológicas foram utilizados camundongos Swiss machos, obtidos do Biotério da UFMT/Cuiabá, tratados com as frações HM e EA. Esta pesquisa foi certificada conforme protocolo nº 23108.701484/14-2 da CEUA-UFMT. Os grupos foram divididos de acordo com o tipo de tratamento: GI-Controle; GII-PCM (paracetamol); GIII-PCM+HM; GIV-PCM+EA; GV-HM; GVI-EA. As frações (100 mg/kg) foram administrados por 7 dias após 3h da indução da lesão com paracetamol (250 mg/kg). Foram realizados testes bioquímicos e os dados foram avaliados por ANOVA seguida por Tukey ($p<0,05$). Os ensaios determinaram os valores para superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa reduzida (GSH), proteínas carboniladas (PC), ácido ascórbico (ASA), derivados do ácido tiobarbitúrico (TBARS) do estresse oxidativo nos tecidos hepático e/ou renal. Avaliaram-se os parâmetros plasmáticos alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicemias, triglicerídeos e colesterol. Os resultados dos fenóis totais $436 \pm 2,96$ e $437 \pm 6,05$ mg EAG/g para HM e EA, respectivamente. Para flavonoides totais um teor $12 \pm 0,18$ e $40 \pm 0,88$ mg EQ/g nas frações HM e EA, respectivamente, a fração EA apresentou EC_{50} 35 µg/mL comparado ao HM com EC_{50} 44 µg/mL. No extrato bruto etanólico foram identificados por LC-MS/MS utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM) os Flavonoides: Amentoflavona, Apigenina, Canferol, Luteolina, Quercetina, Quercetina-3-β-D-glicosídeo, Rutina e Taxifolina. O paracetamol diminuiu a atividade da glutationa-S-tranferase (GST), catalase (CAT) e alanina aminotransferase (ALT) e as concentrações de glutationa reduzida (GSH) e ácido ascórbico (ASA), além de aumentar as proteínas carboniladoas (PC) e a peroxidação lipídica (TBARS). Esses parâmetros voltaram aos níveis do controle no fígado pelos tratamentos com PCM+HM e PCM+EA na CAT, ASA e PC, pelo tratamento PCM+HM no TBARS e PCM+EA na GST. No rim a GSH e a PC foram restauradas pelos tratamentos PCM+HM e PCM+EA. As frações também reduziram os níveis de glicose e de triglicerídeos dosados no plasma. Com base nos dados apresentados, a fração EA demonstra maior capacidade de reverter alterações provocadas nos parâmetros bioquímicos analisados por apresentar concentração de flavonoides e atividade antioxidante maior em comparação com o HM.

Palavras-chave: *Trattinnickia rhoifolia*, compostos fenólicos, Antioxidante, Hepatotoxicidade.

ABSTRACT

Trattinickia rhoifolia is a medicinal plant popularly used to treat throat diseases, skin lacerations, treatment and prevention of tumors and leukemia. The study refers to the isolation of phenolic compounds, evaluation of the biological activity in mice and the sequestering capacity of free radicals in the extracts of the leaves of this plant. The leaves were collected in the municipality of Sinop / MT, dried in an oven, crushed and submitted to extraction of the chemical constituents with ethanol. The crude ethanolic extract was submitted to a partition that gave the hydromethanolic (HM) and ethyl acetate (EA) fractions. The chemical analyzes of total phenols were made by the Folin-Ciocalteau method, the total flavonoids by the aluminum chloride colorimetric method and the antioxidant potential performed by the DPPH• radical reduction method in an efficient concentration to reduce activity by 50% (EC₅₀). Flavonoids identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS / MS). For biological analysis, male Swiss mice were obtained from the UFMT / Cuiabá Vivarium, treated with the HM and EA fractions. This research was certified according to protocol no. 23108.701484 / 14-2 of CEUA-UFMT. The groups were divided according to the type of treatment: GI-Control; GII-PCM (paracetamol); GIII-PCM + HM; GIV-PCM + EA; GV-HM; GVI-EA. Fractions (100 mg / kg) were given 7 days after 3 hours of paracetamol (250 mg / kg) induction of the lesion. Biochemical tests were performed and data were analyzed by ANOVA followed by Tukey ($p < 0.05$). The assays determined the values for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), carbonylated proteins (PC), ascorbic acid (ASA), thiobarbituric acid derivatives (TBARS) of oxidative stress in hepatic and / or renal tissues. Plasma parameters alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glycemia, triglycerides and cholesterol were evaluated. The results of total phenols were 436 ± 2.96 and 437 ± 6.05 mg EAG / g for HM and EA, respectively. For total flavonoids a content of 12 ± 0.18 and 40 ± 0.88 mg EQ / g in the HM and EA fractions, respectively, the EA fraction presented $35 \mu\text{g} / \text{mL}$ EC₅₀ compared to the MH with $44 \mu\text{g} / \text{mL}$ EC₅₀. In the crude ethanolic extract, Flavonoids: Amentoflavone, Apigenin, Canferol, Luteolin, Quercetin, Quercetin-3-β-D-glycoside, Rutin and Taxifoline were identified by LC-MS / MS using multiple reactions monitoring (MRM). Paracetamol decreased the activity of glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) and alanine aminotransferase (ALT) and the concentrations of reduced glutathione (GSH) and ascorbic acid (ASA), besides increasing carbonylated proteins And lipid peroxidation (TBARS). These parameters returned to the levels of the control in the liver by treatments with PCM + HM and PCM + EA in CAT, ASA and PC, by PCM + HM treatment in TBARS and PCM + EA in GST. In the kidney the GSH and PC were restored by PCM + HM and PCM + EA treatments. Fractions also reduced plasma glucose and triglyceride levels. Based on the data presented, the EA fraction shows a greater capacity to revert alterations provoked in the biochemical parameters analyzed because it presents concentration of flavonoids and greater antioxidant activity in comparison to the HM.

Key words: *Trattinnickia rhoifolia*, phenolic compounds, Antioxidant, Hepatotoxicity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
Resumo	13
1. Introdução	14
2. Material e métodos.....	15
2.1. Reagentes químicos	15
2.2. Material vegetal e preparo do extrato	16
2.3. Quantificação de fenóis e flavonoides totais	16
2.4. Determinação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH [•]).....	16
2.5. Análises LC-MS/MS.....	17
2.6. Animais e tratamento	17
2.7. Análises bioquímicos	18
2.7.1. Análises das atividades antioxidantes enzimáticas.....	18
2.7.2. Análises das atividades antioxidantes não enzimáticas.....	18
2.7.3. Marcadores de estresse oxidativo.....	19
2.8. Análise estatística	19
3. Resultados	19
3.1. Rendimento dos fenóis, flavonoides totais e potenciais antioxidantes	19
3.2. Análises LC-MS/MS.....	20
3.3. Análises das atividades antioxidantes enzimáticas do tecido hepático.....	23
3.4. Análises das atividades antioxidantes não enzimáticas do tecido hepático.....	24
3.5. Marcadores de estresse oxidativo do tecido hepático.....	25
3.6. Efeito sobre parâmetros antioxidantes e estresse oxidativo renal.....	25
3.8. Atividade enzimática relacionada á função hepática e parâmetros metabólicos do plasma.....	26
4. Discussão.....	27
Conclusão	32
Referências	33
ANEXO A: Normas para publicação no Journal of Ethnopharmacology	39

CAPÍTULO I

Identificação de flavonoides por LC-MS/MS no extrato de folhas da *Trattinnickia rhoifolia* (Willd) e avaliação da atividade antioxidante

Artigo a ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Identificação de flavonoides por LC-MS/MS no extrato de folhas da *Trattinnickia rhoifolia* (Willd) e avaliação da atividade antioxidante

Lilian Marigo Magalhães^a, Valéria Dornelles Gindri Sinhorin^b, Camila Cristina Pereira de Souza^a, Rogério de Campos Bicudo^c, Adilson Paulo Sinhorin^{a*}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Laboratórios Integrados de Pesquisas em Química (LIPEQ), fitoquímica, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop, Av. Alexandre Feronato, 1200 - St. Industrial, Sinop - MT, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais Laboratórios Integrados de Pesquisas em Química (LIPEQ), bioquímica, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop, Av. Alexandre Feronato, 1200 - St. Industrial, Sinop - MT, Brasil.

^cEmbrapa Agrossilvipastoril, Rodovia MT-222, Km 2,5, s/n - Zona Rural, Sinop - MT, Brasil

Resumo

Relevância etnofarmacológica: *Trattinnickia rhoifolia* é uma planta do tipo angiosperma pertencente à família das Burceraceae conhecida popularmente como breu, classificada na tribo Canarieae. Sua resina e folhas são utilizadas popularmente para tratar doenças de garganta, lacerações de pele, tratamento e prevenção de tumores e leucemia.

Objetivo do estudo: quantificar o teor de fenóis e flavonoides totais presente no vegetal em estudo e sua correlação com a atividade antioxidante, identificar e caracterizar os flavonoides presentes nas folhas dessa espécie. E avaliar o efeito protetor *in vivo* das frações hidrometanólica e acetato de etila de *Trattinnickia rhoifolia* contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol (PCM).

Material e métodos: As folhas foram secas, trituradas e submetidas à extração dos constituintes químicos com etanol. O extrato bruto etanólico foi submetido a uma partição obtendo-se as frações denominadas hidrometanólica (**HM**) e acetato de etila (**EA**). Foram realizadas análises químicas de quantificação por espectrofotômetro UV-Vis dos fenóis totais, flavonoides totais, potenciais antioxidantes e identificação por LC-MS/MS utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM). As análises biológicas realizadas no fígado, rim e plasma dos camundongos foram determinadas após indução da lesão por paracetamol (250 mg/kg) e tratados com as frações **HM** e **EA** (100 mg/kg) por 7 dias.

Resultados: O teor de fenóis, flavonoides totais e EC₅₀ nas frações **HM** e **EA**: 436 e 437 mg EAG/g; 12 e 40 mgEQ/g; EC₅₀ 44 e 35 µg/mL, respectivamente. Foram identificados no extrato bruto os Flavonoides: Amentoflavona, Apigenina, Canferol, Luteolina, Quercetina, Quercetina-3-β-D-glicosídeo, Rutina e Taxifolina. O paracetamol diminuiu a atividade da glutationa-S-tranferase (GST), catalase (CAT) e alanina aminotransferase (ALT) e as concentrações de glutationa reduzida (GSH) e ácido ascórbico (ASA), além de aumentar as proteínas carboniladoas (PC) e a peroxidação lipídica (TBARS). Esses parâmetros voltaram aos níveis do controle no fígado pelos tratamentos com PCM+HM e PCM+EA na CAT, ASA e PC, pelo tratamento PCM+HM no TBARS e PCM+EA na GST. No rim a GSH e a PC foram restauradas pelos tratamentos PCM+HM e PCM+EA. As frações também reduziram os níveis de glicose e de triglicerídeos dosados no plasma.

Conclusão: A fração **HM** e **EA** apresentaram capacidade de reverter alterações provocadas nos parâmetros bioquímicos analisados e o **EA** possui maior teor de flavonoides e consequentemente maior potencial antioxidante em comparação ao **HM**.

Palavras-chave: *Trattinnickia rhoifolia*, compostos fenólicos, Antioxidante, Hepatotoxicidade.

1. Introdução

As plantas são consideradas fontes naturais para tratamento e prevenção de doenças, devido à presença de metabólitos secundários como os polifenóis que possuem, e dentre suas propriedades há a capacidade de agir como antioxidante (Coulibaly et al., 2014; Salgueiro et al., 2016). Entre esses compostos fenólicos estão os flavonoides, presentes em diversas partes das plantas, com potencial de reduzir radicais livres e capacidade de quelar íons metálicos que causam danos à saúde (Behling et al., 2004; Sousa et al., 2007).

Trattinnickia rhoifolia (Willd) é uma espécie arbórea com plantas do tipo angiospermas presente nas regiões neotropicais, pertencente à família das Burceraceae conhecidas popularmente como breu (Lima, 2001) e está classificada na tribo Canarieae (Daly, 1989). Tem sua resina e folhas utilizadas popularmente para curar doenças de garganta, lacerações de pele, tratamento e prevenção de tumores e leucemia (Salazar-Silvera and Rosquete, 2010).

Estudos anteriores sobre a fitoquímica do gênero *Trattinnickia* relatam a presença de lichenxantona, triterpenos e esteróis na casca de *T. peruviana* (Marques e Ribeiro, 1994). Da resina exsudada do tronco de *T. áspера* foram isolados os triterpenos e uma lactona sesquiterpênica (Aregullin et al., 2002). Das folhas de *T. glaziovii* foi identificado o biflavonoide podocarpusflavona A (Siani e Ribeiro, 1995).

Na espécie alvo deste estudo Lima et al. (2004) isolou da casca do tronco, ramos e resina das espécies *T. burserifolia* e *rhoifolia* triterpenos e monoterpenos. Ramos et al. (2003) determinou a presença de monoterpenos voláteis no óleo da resina retirada da árvore da *T. rhoifolia*. No trabalho descrito por Salazar-Silvera and Rosquete (2010) amentoflavona, e esteróis foram isolados como constituintes principais de folhas frescas de *T. rhoifolia* e Rosquete et al. (2010) isolou a partir da resina de *T. rhoifolia* lactonas sesquiterpênicas.

Além da caracterização fitoquímica, a avaliação do efeito biológico de seus constituintes é de grande importância para o estudo de plantas. O modelo de estresse oxidativo induzido por paracetamol vem sendo muito utilizado com a intenção de investigar os efeitos de extratos e/ou frações de extratos de plantas ricas em compostos fenólicos sobre atividades biológicas enzimáticas, não enzimáticas, marcadores de estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos (Hodgman e Garrard, 2012; Olaleye et al., 2014). O paracetamol (acetominofeno) é um medicamento usado como analgésico e antipirético, mas que em altas doses causa toxicidade e a depleção dos órgãos, provocando lesão hepática, levando o organismo ao estresse oxidativo e alterando o sistema antioxidante (Mirochnitchenko et al.,

1999). Por outro lado os antioxidantes agem inibindo e protegendo o organismo contra o processo de estresse oxidativo causados pelos radicais livres e espécies reativas do oxigênio (Nijveldt et al., 2001).

Os flavonoides se tornaram alvo de muitos estudos devido a seus diversos benefícios para a saúde humana. Há relatos que alguns deles como a quercetina, luteolina, apigenina, canferol e rutina apresentam ação anti-inflamatória, antioxidantes, antidiabética e anticancerígena (Duan et al., 2011; Ramirez et al, 2016; Shanmugam et al., 2016) .

Neste contexto, este é o primeiro estudo que teve como objetivo quantificar o teor de fenóis e flavonoides totais presente nas folhas de *T. rhoifolia* e sua correlação com o possível potencial antioxidante bem como, identificar e caracterizar a presença de flavonoides por LC-MS/MS. Após avaliar o efeito hepatoprotetor em camundongos das frações de *Trattinnickia rhoifolia* contra a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes químicos

Solventes etanol, acetato de etila, hexano, diclorometano e metanol (grau P.A.), os flavonoides: amentoflavona, apigenina, canferol, luteolina, quercetina e quercetina-3-β-d-glicosideo, rutina e taxifolina, os reagentes Folin-Ciocalteau, ácido gálico, ácido ascórbico, ketamina, xilaxina, acepromazina, albumina de soro bovino, Triton X-100, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), glutatona reduzida, malondialdeído (MDA), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), 2,4 dinitrofenil-hidrazina (DNPH), reagente de Bradford, ácido tricloroacético (TCA), 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH•), fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sal dissódico, trisaminometano (Tris) e Tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Merck. Os kits para dosagem de colesterol total, triglicerídeos, glicose e alanina aminotransferase (ALT) foram adquiridos da Labtest®, Diagnóstico S. A., Minas Gerais, Brasil.

2.2. Material vegetal e preparação do extrato

As folhas da *T. rhoifolia* estudada foram coletadas na área da UFMT – Sinop – MT localizada a 11°52'00"S 55°28'58"W e identificada pelo professor Juliano de Paulo Santos. A

exsicata foi depositada no Herbário Centro - Norte - Mato - Grossense (CNMT) da Universidade Federal de Mato Grosso - Câmpus de Sinop, sob o número de tombo 6320.

As folhas foram secas em estufa com ventilação forçada, à temperatura de 45 °C trituradas e submetidas à extração por maceração exaustiva (3x) por 7 dias a temperatura ambiente com o etanol (PA). O extrato bruto foi obtido após filtração e evaporação do solvente sob vácuo a 45 °C, posteriormente ressuspenso em metanol/água (1:1 v/v), filtrado para retirada da clorofila e submetido a uma partição com solventes por gradiente de polaridade resultando as frações hidrometanólica (HM) e acetato de etila (EA). Por apresentar alta e média polaridade estas frações foram utilizadas para a realização desse estudo.

2.3. Quantificação de fenóis e flavonoides totais

As análises das frações HM e EA foram determinadas por espectrometria UV-Vis. O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de "Folin-Ciocalteu" em 760 nm segundo Woisky e Salatino (1998) utilizando ácido gálico como padrão para a curva de calibração nas concentrações 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 µg/mL e expresso em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). O teor de flavonoides totais foi medido em 425 nm pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) de acordo com Woisky e Salatino (1998). Para a curva de calibração foi utilizado o padrão de quercetina (0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 µg/mL) e o resultado foi expresso em miligrama de equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g).

2.4. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* (DPPH[•])

A avaliação do potencial antioxidante seguiu a metodologia de Sousa et al. (2007), com adaptações. O método consiste em determinar via espectrofotometria UV-Vis a 515 nm a leitura das absorbâncias da mudança gradativa de coloração por ação do potencial antioxidante dos extratos com capacidade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A partir da comparação com os padrões ácido ascórbico e rutina, nos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional, determinando a concentração eficiente (EC_{50}) como sendo a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50 %.

2.5. Análises por LC-MS/MS

A identificação de flavonoides nas frações **HM** e **EA** do extrato bruto etanólico das folhas de *T. rhoifolia* foi segundo metodologia de Duan, et al. (2011) com modificações, foi caracterizada por comparação do tempo de retenção com os padrões externos autênticos preparados em metanol, filtrados e injetados separadamente: Amentoflavona, Apigenina, Canferol, Luteolina, Quercetina, Quercetina-3-β-d-glicosídeo, Rutina e Taxifolina. A análise de LC-MS/MS foi realizada em um equipamento UHPLC Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, USA), as separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna Agilent Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 3,5μm) a 25 °C com um volume de injeção da amostra de 20 μL. A eluição por gradiente das fases A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase B (0,1 % de ácido fórmico em ACN), foi feitas nas condições: 0-30 min 5-95 % B; 30-32 min 100 % B; 32-33 min 95 – 5 % B com fluxo de 0,5 mL/min. A detecção por espectrometria de massas foi realizada num Agilent 6460 Triple Quad com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), utilizando gás nitrogênio, nas seguintes condições: temperatura do gás de 300 °C; fluxo 5 L/min; pressão do nebulizador 45 psi; temperatura do gás da bainha 250 °C; fluxo 11 L/min; tensão capilar -3500 V e intervalo de varredura de m/z 120-900 unidades.

2.6. Animais e tratamento

Camundongos Swiss machos, peso médio de 32 ± 4 g, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Cuiabá. Os animais foram divididos em 6 grupos de 7-8 animais, aclimatados por 10 dias com controle de foto período de 12 horas claro/escuro, temperatura de 24 ± 1 °C, umidade relativa de 51 ± 2 %, ração e água filtrada em livre demanda.

Os tratamentos foram administrados por via oral (gavagem) e os extratos (HM e EA; 100 mg/kg) dissolvidos em água e tween 80 (0,1%), dose determinada segundo teste hipocrático de Malone por meio de uma curva de doses (50 a 100mg/kg; dados não mostrados). O paracetamol (PCM - 250 mg/kg) foi diluído em água, essa dose foi escolhida seguindo Olaleye e Rocha (2008). De acordo com os tratamentos, os grupos foram divididos em: Grupo I- Controle (água); Grupo II - PCM; Grupo III - PCM + HM; Grupo IV - PCM + EA; Grupo V - HM; Grupo VI - EA. Os animais dos grupos II, III e IV receberam dose única de PCM como indutor de lesão 3 horas antes do início do tratamento diário. As frações foram

administradas nos grupos: III, IV, V e VI e os grupos I e II receberam água + tween 80 (0,1%) durante os 7 dias de tratamento.

Após 24 horas da última dose dos tratamentos, os animais foram submetidos a 6 horas de jejum e anestesiados via intraperitoneal (ketamina 50 mg/Kg, xilaxina 2mg/Kg e acepromazina 2 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca e sacrificados por luxação cervical para a retirada dos órgãos. O tecido fígado e rins foram rapidamente removidos e congelados à -85 °C. Esta pesquisa foi certificada conforme protocolo nº 23108.701484/14-2 do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), UFMT/Cuiabá.

2.7. Ensaio bioquímicos

Para os ensaios bioquímicos foram utilizados plasma, obtido a partir da centrifugação (1000g/10min) do sangue coletado e amostras dos tecidos (fígado e rim) homogeneizados em solução tampão específico para cada técnica descrita.

2.7.1. Análises das atividades antioxidantes enzimáticas

Foram realizadas: superóxido dismutase (SOD) segundo Misra e Fridovich (1972) no fígado (1:20 m/v) com base na inibição da auto-oxidação da epinefrina pela enzima e medida em 480 nm em espectrofotômetro UV- Vis e expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$; a decomposição de H_2O_2 por catalase (CAT) foi avaliada pela alteração na absorvância a 240 nm e foi expressa em μmol de H_2O_2 decomposta por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) segundo Nelson e Kiesow (1972), no fígado (1:30 m/v) e rim (1:20 m/v); a atividade da glutationa-S-transferase (GST) foi medida em espectrofotômetro a 340 nm utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato, no fígado (1:20 m/v) de acordo com Habig et al. (1974) e expressa em $\mu\text{mol GS-DNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

2.7.2. Análises das atividades antioxidantes não enzimáticas

Tióis não-proteicos (GSH) foram dosados pelo método de Sedlack e Lindsay (1968) no fígado (1:40 m/v) e rim (1:30 m/v) com medidas de absorbâncias lida a 412 nm e a concentração de GSH foi calculada através de uma curva padrão de glutationa reduzida (GSH) e os resultados expressos em μmol de GSH. mg proteína^{-1} ; os níveis de ácido

ascórbico (ASA) no fígado (1:15 m/v) foram determinados de acordo com Roe (1954) expressa em $\mu\text{mol ASA.g}^{-1}$ weight.

A concentração de proteína nos ensaios (exceto para ASA) foi medida em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando albumina bovina como padrão, método descrito por Bradford (1976), com as devidas modificações conforme diluição e análise nos tecidos utilizados.

2.7.3. Marcadores de estresse oxidativo

O dano lipídico no fígado (1:8 m/v) foi realizado segundo técnica descrita por Buege e Aust (1978), com algumas modificações. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis a 535 nm e os valores para as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram expressos por $\text{nmol MDA.mg proteína}^{-1}$; e a determinação de proteínas carboniladas (PC) foi realizada segundo Yan et al. (1995) no fígado e rim (1:80 m/v), a absorbância lida a 370 nm e os níveis de PC expressos em $\text{nmol carbonil.mg proteína}^{-1}$.

Para as análises do marcador de dano hepático e parâmetros metabólicos do plasma foram realizadas a dosagem da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) e expressa em U.L^{-1} , assim como a quantificação de glicose, colesterol total e triglicérides do plasma, expressas em mg.dL^{-1} , utilizando kits comerciais.

2.8. Análises estatísticas

Todos os valores foram expressos como médias \pm desvio padrão (DP). Para determinar as diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) de uma via e como *post hoc* teste de Tukey, com $p < 0,05$ como indicativo de nível de significância. Os valores para EC₅₀ foram estimados graficamente por análise de regressão linear.

3. Resultados

3.1. Rendimento dos fenóis, flavonoides totais e potenciais antioxidantes

Conforme tabela 1-A os valores de fenóis totais nas frações EA e HM não apresentaram diferença, já o teor de flavonoides totais foi superior na fração EA. Os resultados do potencial antioxidante através da % DPPH• remanescente, o EC₅₀ das frações foram semelhantes ao padrão ácido ascórbico e rutina com EC₅₀ 38 e 43 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1-A. Valores de fenóis, flavonoides totais e potenciais antioxidantes das frações HM e EA de *T. rhoifolia*.

Análises	HM	EA
Fenóis totais (mgEAG/g)	436 ± 2,96	437 ± 6,05
Flavonoides totais (mgEQ/g)	12 ± 0,18	40 ± 0,88
DPPH• (µg/mL)	EC ₅₀ 44	EC ₅₀ 35

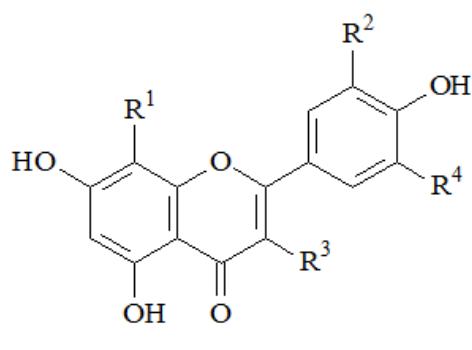
3.2. Análise por LC-MS/MS

Para a identificação dos flavonoides foi utilizado o método de monitoramento de reação múltipla (MRM) no modo de ionização negativo, com os parâmetros descritos na tabela 1-B.

Tabela 1-B. Parâmetros de LC-MS/MS dos 8 compostos identificados no extrato bruto etanólico de *T. rhoifolia*. Tensão de fragmentação (T.F.), energia de colisão (E.C.) e tempo de retenção (T. R.).

	Composto	[M - H] ⁻	T.F./ E.C. (eV)	T.R. (min)	Transição MRM
1	amentoflavona	537,46	10 / 30	17,4	537,46 → 375,00
2	apigenina	269,24	10 / 30	16,6	269,24 → 116,80
3	canferol	285,24	10 / 25	17,1	285,24 → 93,00
4	luteolina	285,24	10 / 30	14,9	285,24 → 133,00
5	queracetina hidratata	301,24	10 / 35	15,0	301,24 → 151,00
6	queracetina-3-β-d-glicosídeo	463,38	10 / 30	10,8	463,38 → 300,00
7	rutina	609,27	10 / 30	10,4	609,27 → 300,20
8	taxifolina	303,25	10 / 15	12,1	303,25 → 125,00

A análise do extrato bruto etanólico apresentou oito flavonoides: na fração HM os compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** e na fração EA os compostos **1, 2, 3, 4, 5 e 6**. Figura 1-A: estrutura química dos oito flavonoides identificados no extrato bruto etanólico de *T. rhoifolia* e Figura 1-B: cromatograma com tempo de retenção dos flavonoides encontrados na fração HM.



Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	apigenin	H	H	H
2	H	H	H	H
3	H	H	OH	H
4	H	OH	H	H
5	H	OH	OH	H
6	H	H	O-glucoside	OH
7	H	H	O-(rhamnosyl-glucoside)	OH
8	H	H	OH	OH

Fig. 1-A: Estrutura química dos oito flavonoides presentes no extrato bruto etanólico de *T. rhoifolia*.

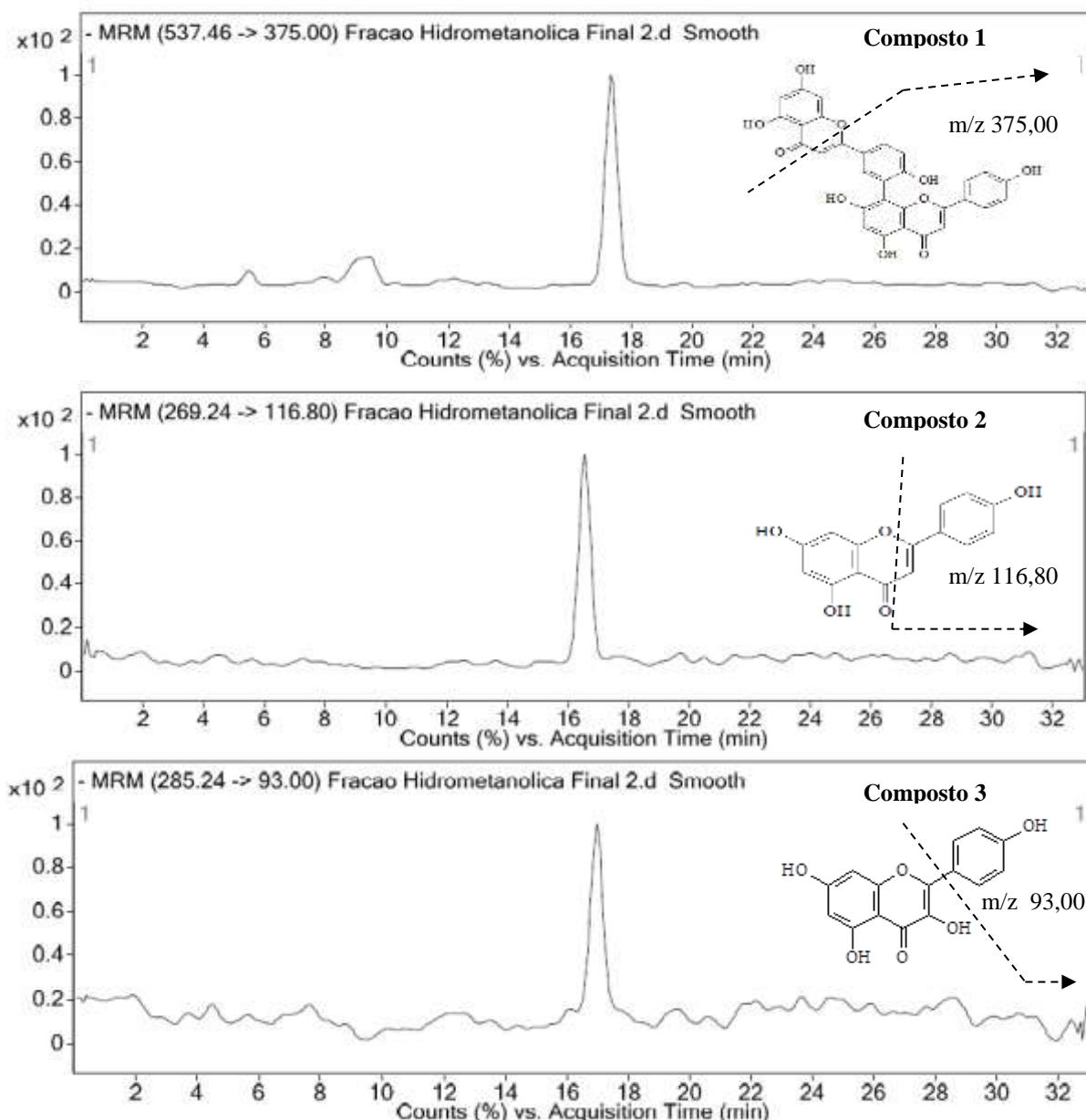


Fig. 1-B. LC-MS/MS da fração HM de *T. rhoifolia*. Cromatogramas com tempo de retenção dos compostos identificados, massa do íon molecular desprotonado, massa do íon principal e quebras das estruturas químicas dos flavonoides identificados.

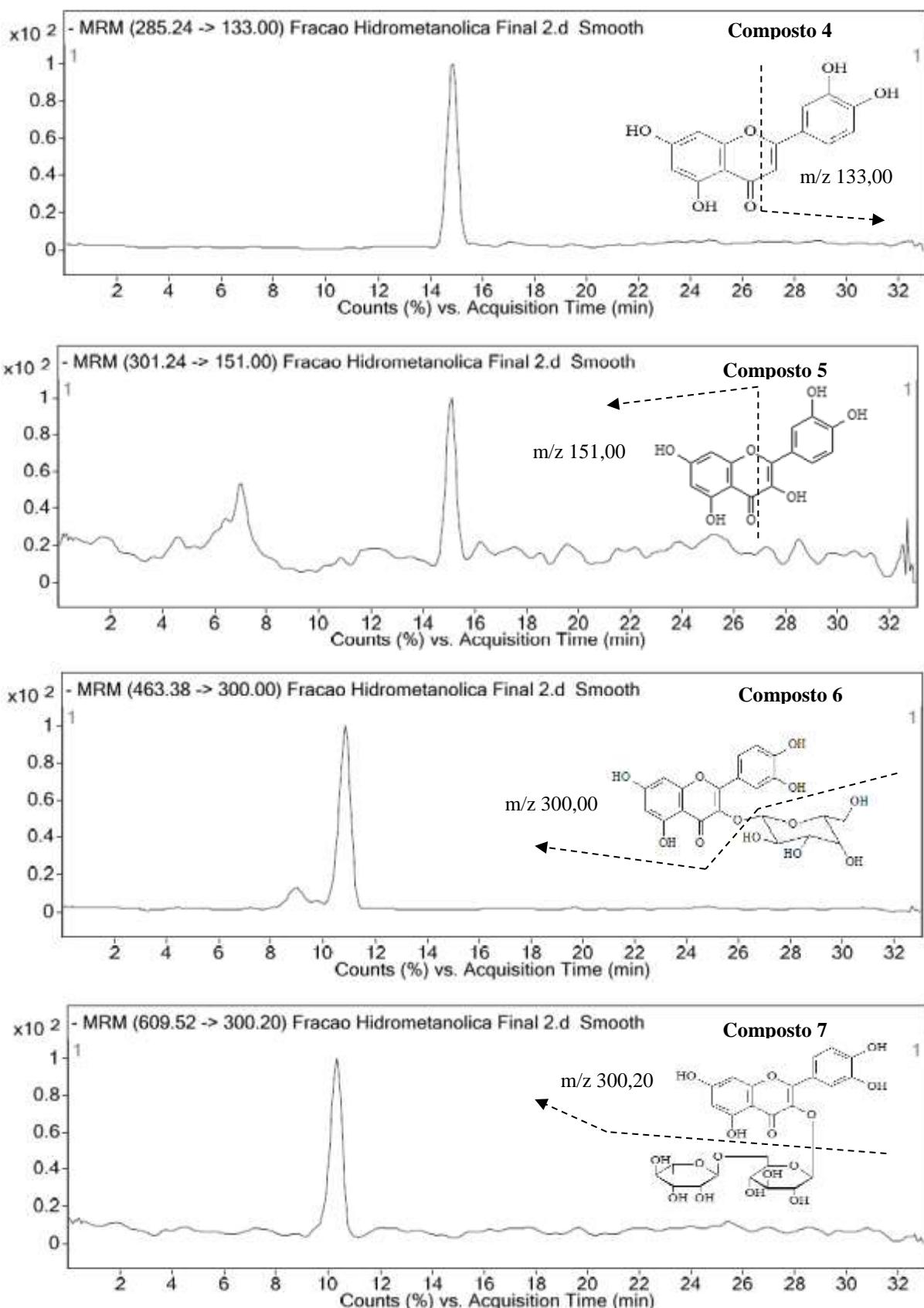


Fig. 1-B. (continuação) LC-MS/MS da fração HM de *T. rhoifolia*. Cromatogramas com tempo de retenção dos compostos identificados, massa do íon molecular desprotonado, massa do íon principal e quebras das estruturas flavonoides identificados.

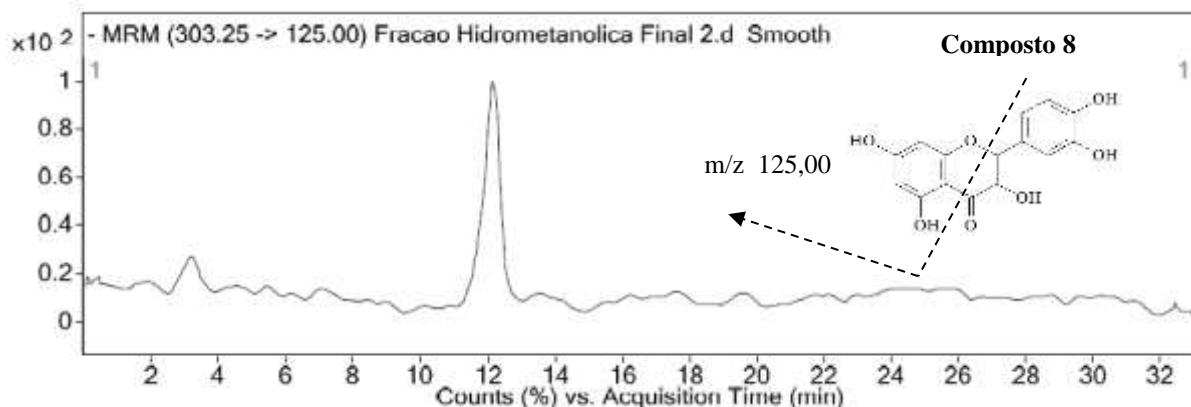
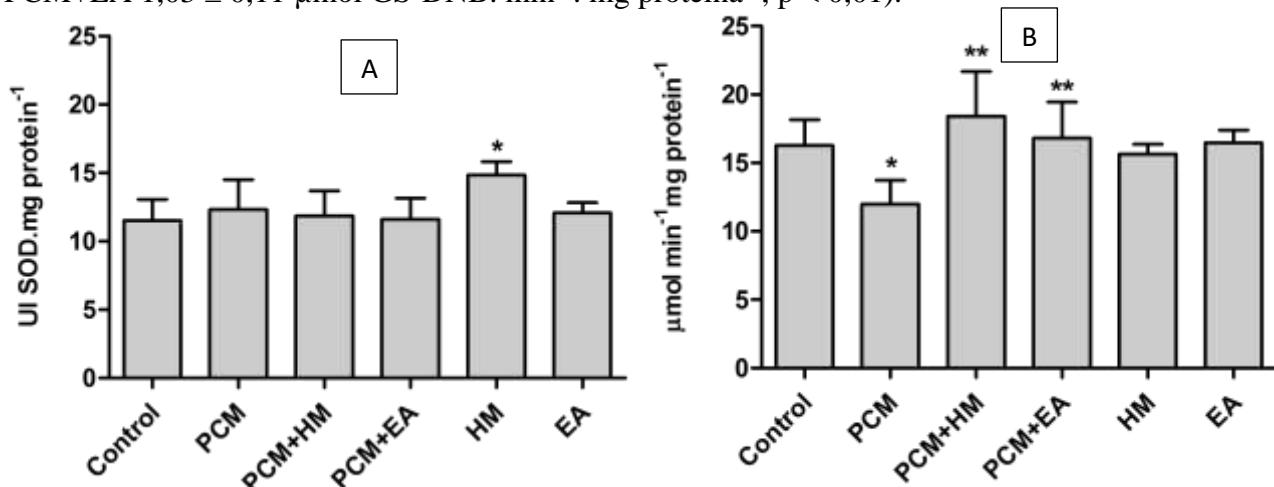


Fig. 1-B. (continuação) LC-MS/MS da fração HM de *T. rhoifolia*. Cromatogramas com tempo de retenção dos compostos identificados, massa do íon molecular desprotonado, massa do íon principal e quebras das estruturas químicas dos flavonoides identificados.

3.3. Análises das atividades antioxidantes enzimáticas do tecido hepático

Conforme demonstrado na Figura 2. A, a atividade da SOD não sofreu alteração nos grupos expostos ao PCM, mas houve um aumento no grupo HM apresentando um nível de significância de $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A enzima CAT teve sua atividade diminuída no grupo PCM ($11,98 \pm 1,75 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$) como mostra a Figura 2. B em relação ao grupo controle ($16,28 \pm 1,88 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$) e os grupos PCM+HM e PCM+EA foram capazes de restaurar os níveis dessa atividade enzimática ($18,43 \pm 3,26$; $16,83 \pm 2,62 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente; $p < 0,001$). A GST do fígado (Figura 2. C) sofreu redução de sua atividade no grupo PCM ($0,79 \pm 0,06 \mu\text{mol GS-DNB. min}^{-1}\text{.mg proteína}^{-1}$) versus grupo controle ($1,03 \pm 0,11 \mu\text{mol GS-DNB. min}^{-1}\text{.mg proteína}^{-1}$) e o tratamento foi capaz de restabelecer essa diminuição aos níveis do controle (grupo PCM+EA $1,03 \pm 0,11 \mu\text{mol GS-DNB. min}^{-1}\text{.mg proteína}^{-1}$; $p < 0,01$).



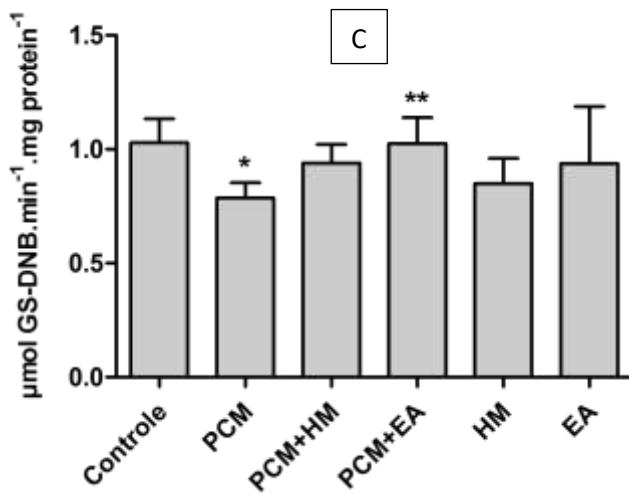


Fig. 2. Efeito das frações HM e EA em fígado de camundongos submetidos ao estresse oxidativo induzido por acetaminofeno na atividade das enzimas: **A.** SOD * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; **B.** CAT * $p < 0,001$ comparado ao grupo controle. ** $p < 0,001$ comparado ao grupo PCM e **C.** GST * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo PCM. Os valores são média ± DP. (N = 8).

3.4. Análises das atividades antioxidantes não enzimáticas do tecido hepático

Na GSH (Figura 2. **D**) houve uma diminuição no grupo PCM, PCM+HM e PCM+EA ($47,58 \pm 5,64$; $46,12 \pm 10,57$; $46,98 \pm 9,25$ μmol de GSH. mg proteína^{-1} , respectivamente) em comparação ao grupo controle ($65,22 \pm 7,3$ μmol de GSH. mg proteína^{-1}) apresentando $p < 0,0001$ de significância. O ácido ascórbico (ASA) apresentou redução dos seus níveis no grupo PCM ($0,83 \pm 0,05$ $\mu\text{mol ASA. g}^{-1}\text{weight}$) em relação ao grupo controle ($1,11 \pm 0,17$ $\mu\text{mol ASA. g}^{-1}\text{weight}$). Já os grupos PCM+HM ($1,13 \pm 0,15$ $\mu\text{mol ASA. g}^{-1}\text{weight}$) e PCM+EA ($1,09 \pm 0,14$ $\mu\text{mol ASA. g}^{-1}\text{weight}$) ambos $p < 0,01$ conseguiram restaurar esses níveis como mostra na Figura 2. **E**.

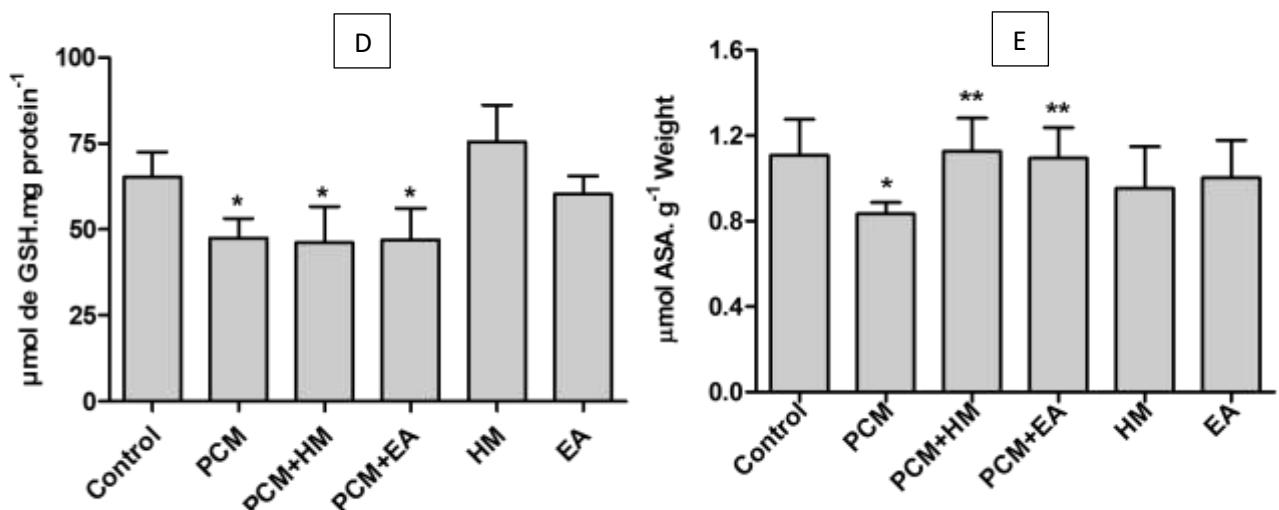


Fig. 2. Efeito das frações HM e EA em fígado de camundongos submetidos ao estresse oxidativo induzido por acetaminofeno na concentração de: **D.** GSH * $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle e **E.** ASA * $p < 0,01$ comparado ao grupo PCM. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo PCM. Os valores são média ± DP. (N = 8).

3.5. Marcadores de estresse oxidativo do tecido hepático

Conforme apresentado na Figura 2.F., há um aumento na peroxidação lipídica (TBARS) no grupo PCM ($0,42 \pm 0,06$ nmol MDA.mg proteína $^{-1}$) quando comparado ao grupo controle ($0,24 \pm 0,05$ nmol MDA. mg proteína $^{-1}$) que foi reduzido para tratamento com HM (grupo PCM+HM $0,26 \pm 0,06$ nmol MDA. mg proteína $^{-1}$; $p < 0,0001$), porém o mesmo não ocorreu para o tratamento com EA ($0,39 \pm 0,07$ nmol MDA. mg proteína $^{-1}$). Na Figura 2.G observa-se que o PCM induziu um aumento significativo dos níveis das proteínas carboniladas ($7,06 \pm 1,69$ nmol carbonil. mg proteína $^{-1}$) quando comparado ao grupo controle ($4,45 \pm 0,82$ nmol carbonil. mg proteína $^{-1}$), e os tratamentos e foram capazes de restabelecer esse quadro (PCM+HM $4,41 \pm 1,04$ e PCM+EA $5,31 \pm 0,99$ nmol carbonil. mg proteína $^{-1}$; $p < 0,0001$).

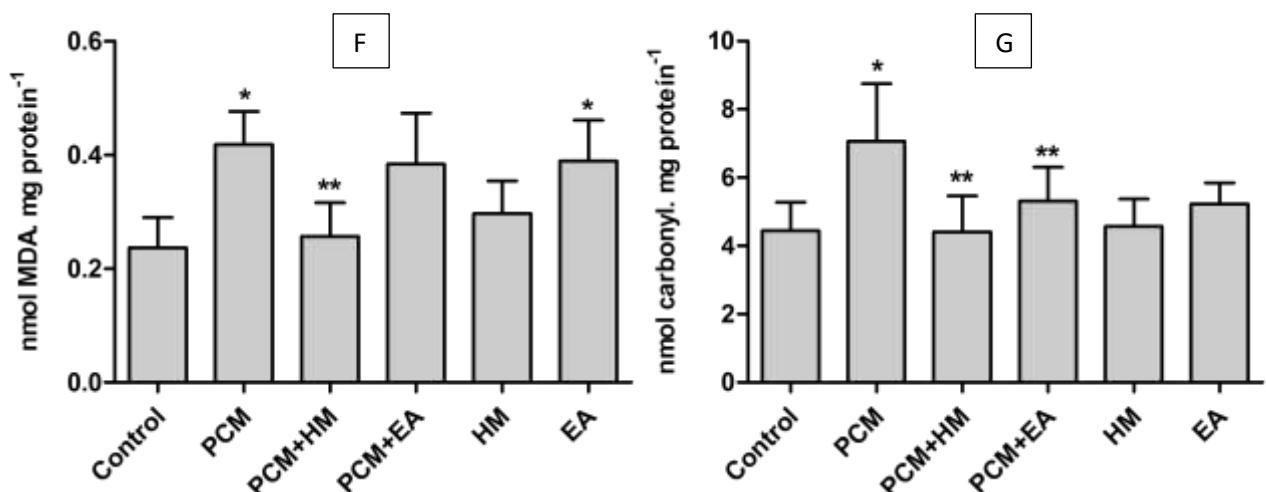


Fig. 2. Efeito das frações HM e EA em fígado de camundongos submetidos ao estresse oxidativo induzido por acetaminofeno na concentração de: **F.** TBARS e **G.** PC ambos * $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle. ** $p < 0,0001$ comparado ao grupo PCM. Os valores são média \pm DP. (N = 8).

3.6. Efeitos sobre parâmetros antioxidantes e estresse oxidativo renal

A CAT sofreu um aumento de sua atividade nos grupo PCM+HM, PCM+EA e EA ($18,79 \pm 1,94$; $19,75 \pm 2,64$ e $22,30 \pm 4,19$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente) em relação ao grupo controle ($14,56 \pm 2,27$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) apresentando um nível de significância $p < 0,0001$, como mostra a Figura 3. A. Já na GSH do rim (Figura 3. B) houve redução de sua concentração no grupo PCM ($13,62 \pm 3,07$ $\mu\text{mol de GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) se comparado ao grupo controle ($24,58 \pm 2,31$ $\mu\text{mol de GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), e os grupos

PCM+HM ($22,53 \pm 4,29 \mu\text{mol de GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) e PCM+EA ($22,46 \pm 4,62 \mu\text{mol de GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) reverteram essa diminuição apresentando um nível de significância de $p < 0,0001$. A Figura 3. C. mostra os efeitos sobre as proteínas carboniladas onde o grupo PCM teve seus níveis aumentados ($14,95 \pm 3,73 \text{ nmol carbonil} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) comparado ao grupo controle ($9,01 \pm 2,10 \text{ nmol carbonil} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) que foi restaurado significativamente ($p < 0,0001$) tanto pelo grupo PCM+HM ($9,34 \pm 1,67 \text{ nmol carbonil} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) quanto pelo grupo PCM+EA ($10,99 \pm 1,87 \text{ nmol carbonil} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

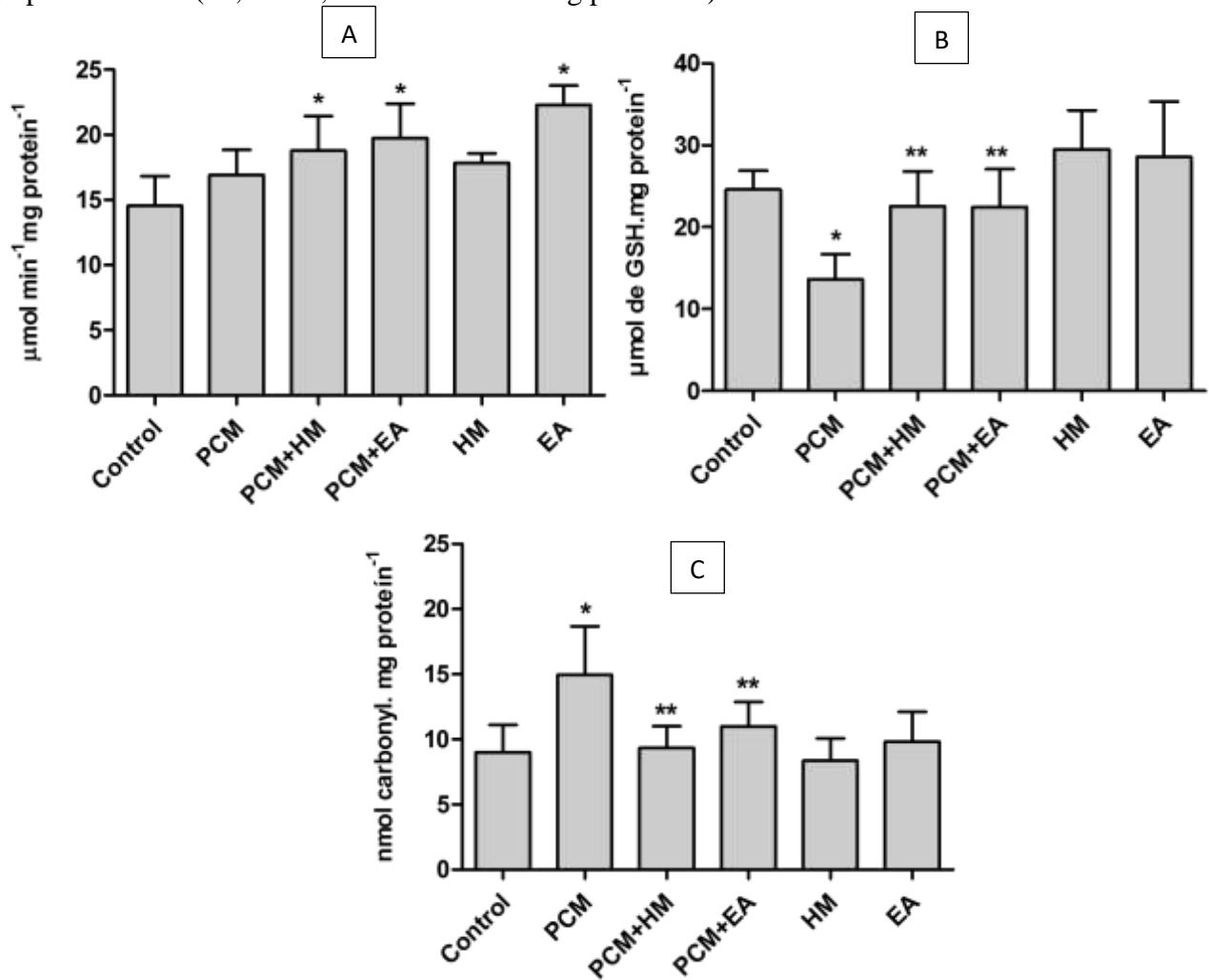


Fig. 3. Efeito das frações HM e EA em rins de camundongos submetidos ao estresse oxidativo induzido por acetaminofeno. **A.** atividade da enzima CAT; **B.** concentração de GSH e **C.** concentração de PC. * $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle. ** $p < 0,0001$ comparado ao grupo PCM. Os valores são média \pm DP. (N = 8).

3.7. Atividade enzimática relacionada à função hepática e parâmetros metabólicos do plasma

A análise da atividade enzimática ALT no plasma apresentou aumento significativo ($p < 0,0001$) no grupo PCM de aproximadamente 67,8 % e no grupo HM de 90,0 % em relação ao grupo controle. O grupo PCM+EA foi capaz de reduzir este aumento da ALT em torno de 51,9 %. As frações HM e EA demonstraram capacidade de diminuir os níveis glicêmicos

(atividade hipoglicemiante) em 30,0 % e 24,5 % (confere) nas frações HM e EA, respectivamente se comparados ao grupo controle. O colesterol total não apresentou diferenças significativas nos grupos de interesse. Na dosagem do triglicerídeo ambas as frações tiveram seus níveis significativamente reduzidos HM (32,5 %) e EA (28,4 %) em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito das frações hidrometanólica e acetato de etila das folhas da *T. rhoifolia* em relação às análises bioquímicas do plasma.

Grupo	Tratamento	ALT (U.L ⁻¹)	Glicose (mg.dL ⁻¹)	Colesterol (mg.dL ⁻¹)	Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)
I	Controle	39.96 ± 3.52	250.6 ± 19.71	40.31 ± 9.06	268.8 ± 53.30
II	PCM	67.05 ± 11.16*	237.2 ± 24.42	49.74 ± 3.16	251.4 ± 24.88
III	PCM+HM	64.17 ± 8.35	275.7 ± 30.06	46.32 ± 6.49	210.3 ± 35.03
IV	PCM+EA	34.80 ± 6.18**	221.6 ± 48.12	40.18 ± 7.74	146.6 ± 31.37
V	HM	75.94 ± 13.76*	175.4 ± 36.31*	41.45 ± 7.69	181.5 ± 41.71*
VI	EA	46.02 ± 10.13	189.0 ± 29.19*	48.29 ± 5.24	192.5 ± 41.07*

Os valores são média ± DP. (N = 7); * $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle, ** $p < 0,0001$ comparado ao grupo PCM.

4. Discussão

Dentre as diversas classes de produtos naturais bioativos, no grupo de substâncias polifenólicas estão os flavonoides, em destaque, e que é amplamente distribuído pelo reino vegetal e notável por suas diversificadas ações biológicas (Coutinho et al., 2009). Os flavonoides podem apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (Simões et al., 2004). Em relação a *T. rhoifolia* há poucos estudos sobre o extrato etanólico de folhas da planta, o que faz o presente estudo ser inédito em relação aos resultados apresentados. Sabe-se que essa espécie pertence a uma família conhecida por produzir óleos aromáticos, resina para tratamento de diversas doenças e que a madeira de sua árvore é utilizada na construção civil e para confecção de artefatos e móveis (Castro et al., 2012).

No presente estudo a fração acetato de etila (EA) apresentou teor de flavonoides superior à fração hidrometanólica (HM) que pode estar associado ao fato de que para melhorar a extração e obter maior rendimento a seleção das condições e solventes influencia

na capacidade de se ter uma boa solubilidade dos radicais substituídos dos flavonoides (Al-Saeedi e Hossain, 2015).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) representa uma ferramenta poderosa, rápida e confiável para a análise e identificação de compostos (Cuyckens e Claeys, 2004). A utilização de uma fase móvel contendo acetonitrila e uma concentração 0,1% de ácido fórmico proporciona uma maior sensibilidade, menor ruído de fundo e aumenta a eficiência da ionização por electropulverização (ESI) para compostos fenólicos (Duan et al., 2011). Para identificar os flavonoides nas frações utilizou-se o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) que teve seus íons precursores e íons produto inicialmente caracterizados de acordo com seus espectros de massa (Qiu et al., 2015).

Os resultados mostraram que ESI em modo de íons negativos foi mais sensível para compostos fenólicos no presente estudo, assim como os parâmetros MS/MS otimizados e as transições de MRM foram consistentes com as investigações anteriormente descritas (Biesaga e Pyrzynska, 2009; Duan et al., 2011; Faccin et al., 2016; Tang et al., 2014; Xie et al., 2011).

Quando analisados por LC-MS/MS a presença dos flavonoides nas frações foram confirmadas através de seus íons moleculares e respectivos fragmentos. O Composto **1** apresentou íon molecular 537,46 (m/z -1) e fragmento 375,00 (m/z – 162,46) que representa a perda do fragmento localizado no anel C que apresenta as funções fenol, éter e cetona. O Composto **2** apresentou o íon molecular 269,24 (m/z -1) e fragmento 116,80 (m/z –152,44) que representa a quebra do anel C entre os carbonos 2 e 3. O Composto **3** apresentou íon molecular 285,24 (m/z -1) e fragmento 93,00 (m/z –192,25) que corresponde à perda de um grupamento fenol. O Composto **4** apresentou íon molecular 285,24 (m/z -1) e fragmento 133,00 (m/z –152,24) que representa a perda do anel benzeno-diol. O Composto **5** apresentou o íon molecular 301,24 (m/z -1) e fragmento 151,00 (m/z –150,24) que corresponde também à quebra do anel C entre os carbonos 2 e 3, e apresenta três hidroxilas. Já o Composto **6** apresentou íon molecular 463,38 (m/z -1) e fragmento 300,00 (m/z –163,38) que representa a quebra de um açúcar. O Composto **7** apresentou íon molecular 609,52 (m/z -1) e fragmento 300.20 (m/z –309,32) que corresponde à perda dos dois açúcares que ela apresenta. O Composto **8** apresentou íon molecular 303,25 (m/z -1) e fragmento 125,00 (m/z –178,25) que representa a quebra no anel C entre o carbono 2 e a carbonila. As análises apresentaram fragmentações similares já descritas na literatura por Xie et al. (2011); Qiu et al. (2015); Tang et al. (2014); Orčić et al. (2014) e Touati et al. (2016).

Aos flavonoides identificados nas folhas de *T. rhoifolia* são atribuídas principalmente à propriedade antioxidante, que oferece proteção aos sistemas renal, cardiovascular e hepático

(Behling et al., 2004). Eles agem inibindo o processo de formação de radicais livres pela interação com ânions superóxido, a formação de radicais hidroxilas produzidas pela Reação de Fenton ou Harber-Weis na quelação de íons metálicos e na peroxidação lipídica por reagir com radicais peroxila e alcoxila. Podem atuar também como pró-oxidantes dependendo do número de grupos hidroxilas presentes em sua estrutura (Afanas'ev et al., 1989; Heim et al., 2002).

Os radicais livres são produzidos no corpo humano a partir do metabolismo normal ou induzidos por fatores físicos e/ou químicos no ambiente (Bouterfas, 2016). O 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH•) é um radical livre estável que é amplamente utilizado em soluções para uma estimativa simples da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nas plantas (Achat et al., 2016). A fração EA apresentou maior capacidade de sequestrar esse radical livre, por possuir maior concentração de flavonoides, sugerindo um aumento do efeito protetor antioxidante e favorecendo assim o sistema biológico (Behling et al., 2004). Alguns estudos relatam que os radicais livres reagem com óxido nítrico que em altas concentrações causam danos oxidativos, e que os flavonoides queracetina e canferol presentes nas frações de *T. rhoifolia* agem na inibição de produção óxido nítrico através da regulação da atividade indutível da enzima iNOS (Coutinho et al., 2009; Marković et al., 2014).

O estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio do sistema antioxidante gera excesso de radicais livres que podem ocasionar danos a células e tecidos (Halliwell e Whiteman, 2004). Os mecanismos de defesa antioxidante do corpo incluem duas linhas, as enzimáticas e não enzimáticas (Ferreira e Matsubara, 1997). Quando esses sistemas não são eficazes o dano oxidativo pode ser avaliado através de marcadores gerados pela oxidação de biomoléculas (Barbosa et al., 2010).

O paracetamol (N-acetil-p-aminofenol/ PCM) é um fármaco analgésico e antipirético amplamente utilizado e seguro quando administrado em doses terapêuticas. Quando ingerido em doses elevadas pode causar necrose hepática após a sua conversão pelo citocromo P450 enzima metabolizadora de fármacos, para um metabólito reativo, o N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), que se liga covalentemente a proteínas e reage rapidamente com a glutationa, causando a depleção hepática da GSH (Olaleye et al., 2014; Shanmugam et al., 2013). O estresse oxidativo provocado pelo excesso de NAPQI e o aumento na produção de espécies reativas do oxigênio durante o dano ao tecido tem demonstrado que afeta o sistema antioxidante do organismo (Olaleye e Rocha, 2008; Silva et al., 2012).

Os resultados obtidos nas análises demostram que o PCM causou a redução da CAT, GST, GSH e ASA e o aumento do TBARS e PC no fígado. No rim diminuiu a GSH e elevou

a PC, o que comprova os danos causados pelo PCM ao sistema de defesa antioxidante. Estudo realizado por Shanmugam et al.(2016) em extrato de folhas indica uma possível função dos compostos luteolina e quercetina-3-β-d-glicosídeo de aliviar os danos hepáticos do fígado frente a uma intoxicação.

A GSH é o antioxidante intracelular mais prevalente, importante e multifuncional presente em todos os organismos vivos, é caracterizado por um grupo tiol reativo e ligação γ-glutamil que se revela ser um agente de captura natural na detoxificação de radicais livres assim como de eletrófilos reativos (Suke et al., 2013; Sentellas et al., 2014). No presente estudo a GSH do fígado sofreu redução nos grupos PCM e tratados com as frações. Isto pode estar associado ao fato de que os flavonoides, como a quercetina pode se conjugar com tióis e reduzir sua capacidade de eliminação de peroxinitrito e seu potencial antioxidante (Pollard et al., 2006). Em contrapartida, no rim apesar da queda da atividade pelo PCM a concentração de GSH foi normalizada pelos tratamentos, sugerindo que pode ser devido à menor disponibilidade de GSH encontrada neste tecido em comparação ao fígado (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

Uma importante enzima antioxidante envolvida no processo de detoxificação e excreção de xenobióticos e drogas, a GST, teve seus níveis diminuídos pelo tratamento com PCM no fígado como esperado. A fração EA reverteu essa atividade reduzida pelo PCM indicando que os compostos presentes nesta fração têm constituintes antioxidantes que facilitam o consumo rápido e eficiente de espécies reativas de oxigênio contribuindo na metabolização de compostos tóxicos para compostos não tóxicos (Singh et al., 2015).

Os sistemas biológicos se protegem contra espécies reativadas por meio de enzimas antioxidantes endógenas SOD e CAT que são responsáveis pela dismutação de radicais superóxido em H₂O₂ e desintoxicação de H₂O₂ em água, respectivamente, oferecendo proteção contra danos teciduais (Olaleye et al., 2014). A redução da CAT no fígado está ligada à exaustão da enzima como resultado do estresse oxidativo causado por PCM e os tratamentos realizados nesse experimento aumentaram a atividade dessa enzima evidenciando a propriedade antioxidante das frações contra radicais livres de oxigênio (Srinivasan et al., 2007). Por outro lado, pode sugerir que a reversão do dano e o aumento da atividade da CAT pela fração EA no rim pode estar relacionado à capacidade dos flavonoides de aumentar a função dos antioxidantes endógenos (Nijveldt, 2001; Olaleye et al., 2014).

O sistema de defesa não enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Barbosa et al., 2010). O ácido ascórbico (ASA) é um excelente antioxidante, solúvel em

água, essencial ao homem pela sua ação como agente redox em sistemas biológicos (Suke et al., 2013). Ele é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato que possui a propriedade de converter as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em espécies inofensivas, agindo como antioxidante *in vivo* (Barreiros et al., 2006). A reversão hepática do efeito tóxico do PCM sobre a via do ascorbato pode ser resultado da capacidade dos flavonoides presente nas frações de *T. rhoifolia* agir como antioxidantes, inativando radicais livres em ambos os compartimentos celulares, hidrofílico e lipofílico (Bianchi e Antunes, 1999).

A peroxidação lipídica é um processo induzido por radicais livres podendo levar a ruptura da membrana celular pelo sequestro de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados (Puntel et al., 2007). Neste estudo, os animais intoxicados com PCM apresentaram aumento de TBARS, e o tratamento feito com a fração HM reverteu tal efeito. Já os animais tratados somente com a fração EA sofreram igualmente intoxicação. Esse fato pode ser decorrente de que os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, que além de antioxidante podem atuar como pró-oxidante dependendo das condições e dos tecidos se auto-oxidando e os produtos da auto-oxidação podem reagir ou reduzir as concentrações do sistema de defesa antioxidant (Behling et al., 2004; Pereira et al., 2013). O fato de a fração HM ter restaurado o dano lipídico sugere como descrito por Heim (2002) a glicosilação e metilação de grupos OH dos flavonoides, como exemplo a rutina, atenuam o comportamento pró-oxidante dos flavonoides.

Outro marcador oxidativo, a carbonilação de proteínas (PC) teve sua toxicidade pelo PCM abolida tanto no fígado como no rim pelas frações HM e EA de *T. rhoifolia* por possuírem compostos com capacidade de contribuir na manutenção do equilíbrio redox das atividades enzimáticas antioxidantes (Carvalho et al., 2013). De acordo com características estruturais específicas, os flavonoides podem quitar uma vasta gama de íons metálicos de interesse biológico (ferro, cobre e zinco) para formar complexos que apresentam novas atividades farmacológicas ou melhorar a sua atividade (Imessaoudene et al., 2016).

O grupo PCM apresentou um aumento na atividade da ALT no plasma indicando que a dose testada pode causar dano hepático, como já demonstrado em diversos estudos e que a reversão pela fração EA pode ser indicativo de não toxicidade para os hepatócitos ou ainda capacidade de restaurar a atividades desta enzima sugerindo a influência reguladora de compostos antioxidante presente no extrato (Olaleye et al., 2014).

A redução da glicose e do triglicerídeo sugere que a *T. rhoifolia* apresenta efeito hipoglicêmico e hipolipidêmico, pois a espécie estudada apresentou em sua constituição compostos fenólicos e flavonoides que além das inúmeras propriedades, possui a

possibilidade de modificar várias funções fisiológicas pela interação com enzimas como citocromo P450 e transportadores de membrana como as proteínas transportadoras de glicose (Dornas et al., 2007). Dhanya et al. (2014) sugerem que a quercetina e a rutina têm potencial antidiabético e antioxidante, mas sua magnitude de ação varia e ambas podem ser considerada como um suplemento dietético com potencial para a prevenção e tratamento do diabetes tipo 2 e para suprimir o dano mediado pelo estresse oxidativo na fisiopatologia diabética. Ramchoun et al. (2012) descrevem que a capacidade de reduzir o triglicerídeo pode se dar pela supressão da modificação oxidativa dos lípidos e lipoproteínas plasmáticos devido a presença de compostos fenólicos em extratos de plantas com potencial antioxidantes.

Assim esse estudo e seus resultados sugerem que a concentração e a forma que o flavonoide se apresenta quanto ao tipo de conjugado e sua localização no esqueleto do mesmo influencia na taxa de absorção, na capacidade de inibição de enzimas, na atividade antioxidante e na ação protetora contra agentes endógenos e exógenos (PCM) que podem atacar o organismo.

Conclusão

Os resultados mostram que o extrato etanólico das folhas de *T. rhoifolia* possui potencial antioxidante devido à presença de compostos fenólicos e flavonoides. Com exceção do flavonoide Amentoflavona já descrita na espécie foram identificados ainda os flavonoides, Apigenina, Canferol, Luteolina, Quercetina, Quercetina-3-β-d-glicosídeo, Rutina e Taxifolina inéditos para as folhas dessa planta *T. rhoifolia*. Os dados apresentados leva a concluir que a fração EA apresentou capacidade antioxidante e reparadora do estresse oxidativo superior nas análises químicas e biológicas analisadas, fato relacionado à maior concentração de flavonoides. A planta apresenta também atividade redutora de glicose e triglicerídeo, indicando uma possível ação hipoglicêmica e hipolipidêmica. Dessa forma o presente estudo vem contribuir significativamente para a literatura, pois apresenta constituintes químicos e propriedades farmacológicas do extrato das folhas de *T. rhoifolia*, relatadas pela primeira vez

Agradecimentos

Agradeço a UFMT/Sinop pela estrutura e ao órgão FAPEMAT pelo apoio financeiro e a EMBRAPA Agrossilipastoril/Sinop pelas análises LC-MS.

Referências

- Achat, S., Rakotomanomana, N., Madani, K., Dangles, O., 2016. Antioxidant activity of olive phenols and other dietary phenols in model gastric conditions: Scavenging of the free radical DPPH and inhibition of the haem-induced peroxidation of linoleic acid. *Food Chemistry*, v. 213, p. 135–142.
- Afanas'ev, I. B., Dcrozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., Potapovitch, A. I., 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, v. 38, n. 11, p. 1763–1769.
- Al-Saeedi, A. H., Hossain, M. A., 2015. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 5, n. 4, p. 316–321.
- Aregullin, M., Gompper, M. E., Rodriguez, E., 2002. Triterpenes and a sesquiterpene lactone in the resin of *Trattinnickia aspera* (Burseraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, n. 2, p. 187–188.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., Paula, S.O.de, Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629–643.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P., 2006. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123.
- Behling, E. B., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. D. L. P., 2004. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais E. Alimentos e Nutrição - *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, v. 15, n. 3, p. 285–292.
- Bianchi, M. D. L. P., Antunes, L. M. G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123–130.
- Biesaga, M., Pyrzynska, K., 2009. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 38, p. 6620–6626.
- Borges, L. L., Lúcio, T. C., Gil, E. S., Barbosa, E. F., 2011. Uma Abordagem Sobre Métodos Analíticos para Determinação da Atividade Antioxidante em Produtos Naturais. *Encyclopédia Biosfera*, v.7, n.12, p.1-20.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., Benchiha, W., 2016. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2016.07.002>.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*,

v. 72, n. 1–2, p. 248–254.

Buege J.A., Aust S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology vol. 52, p. 302–310.

Carvalho, N. R., Da Rosa, E. F., Da Silva, M. H., Tassi, C. C., Corte, C.L. D., Carbajo-Pescador, S., Mauriz, J.L., González-Gallego, J. Soares, F. A., 2013. “New Therapeutic Approach: Diphenyl Diselenide Reduces Mitochondrial Dysfunction in Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure.” PLoS ONE 8(12): 1–13.

Castro, J. P., Mady, F. T. M., Higuchi, N., Vasconcellos, F. J. de, Freitas, J. A. de, Silva, B. N. S. da, 2012. Caracterização das madeiras denominadas de pau-de-escora comercializadas na cidade de Manaus, Amazonas. CERNE, 18(4), 557-563

Coulibaly, A. Y., Hashim, R., Sulaiman, S. F., Sulaiman, O., Ang, L.Z.P., Ooi, K.L., 2014. Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7, n. S1, p. S553–S559.

Coutinho, M. A. S., Muzitano, M. F., Costa, S. S., 2009. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. Revista virtual de química, v. 1, n. 3, p. 241–256.

Cuyckens, F., Claeys, M., 2004. SPECIAL FEATURE : Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. , JournaL of Mass Spectrometry, v. 39: p. 1–15.

Daly, D. C., 1989. Studies in Neotropical Burseraceae. II. Generic Limits in New World Protieae and Canarieae. Brittonia, v. 41, n. 1, p. 17–27.

Dhanya, R., Arun, K. B., Syama, H. P., Nisha, P., Sundaresan, A., Santhosh Kumar, T. R., Jayamurthy, P., 2014. “Rutin and Quercetin Enhance Glucose Uptake in L6 Myotubes under Oxidative Stress Induced by Tertiary Butyl Hydrogen Peroxide.” Food Chemistry 158: 546–54.

Dornas, W. C. A., Oliveira, T. T. D., Dores, R. G. R. D., Santos, A. F. D., & Nagem, T. J., 2007. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada, v. 28, n.3, p. 241- 249.

Duan, K., Yuan, Z., Guo, W., Meng, Y., Cui, Y., Kong, D., Zhang, L., 2011. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of Verbena officinalis L. extract. Journal of Ethnopharmacology, v. 135, n. 2, p. 201–208.

Faccin, H., Viana, C., Nascimento, P. C. do, Bohrer, D., Carvalho, L. M. de., 2016. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v. 1427, p. 111–124.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L. S., 1997. “Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa E Estresse Oxidativo.” Medicina 43(1): 61–68.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249:7130-7139.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231–55.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., 2002. “Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships.” *13: 572–84*.
- Hodgman, M. J, and Garrard, A. R., 2012. “A Review of Acetaminophen Poisoning.” *Critical Care Clinics* 28(4): 499–516.
- Imessaoudene, A., Merzouk, H., Berroukeche, F., Mokhtari, N., Bensenane, B., Cherrak, S., Merzouk, S. A., Elhabiri, M., 2016. “Beneficial Effects of Quercetin-Iron Complexes on Serum and Tissue Lipids and Redox Status in Obese Rats.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 29: 107–15.
- Lima, M. da Paz, Braga, P. A. de C., Macedo, M.L., Silva, M. F. das G. F. da, Ferreira, A. G., Fernandes, J. B., Vieira, P.C., 2004. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 15, No. 3, 385-394.
- Lima, J. A. De S. (Embrapa). 2001. “Padrões de Distribuição Espacial, Características Ecológicas E Silviculturais de Breu Branco.”: 8–11.
- Limón-Pacheco, J., and Gonsebatt, M. E., 2009. “The Role of Antioxidants and Antioxidant-Related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress.” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1–2): 137–47.
- Marques, M.F.S., Ribeiro, M.N. DE S., 1994. *Acta Amazonica* 24, 49.
- Mirochnitchenko,O., Weisbrot-lefkowitz, M., Reuhl, K., Chen,L., Yang,C., Inouye M., 1999. Acetaminophen toxicity. *The journal of biological chemistry*, v. 274, n. 15, p.10349–10355.
- Misra, H. P., Fridovich, I., 1972. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 247, n. 10, p. 3170–3175.
- Marković, J. M. D., Amić, D., Lučić, B., Marković, Z. S., 2014. Oxidation of kaempferol and its iron(III) complex by DPPH radicals: Spectroscopic and theoretical study. *Monatshefte fur Chemie*, v. 145, n. 4, p. 557–563.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Analytical Biochemistry* 49, 474–478.
- Niculau, E. S., Freitas, S. D. L. de, Sá, I. C. G. de, Fernandes, J. B., Silva, M. F. G. F. da.,

2016. Quantitative Analysis of Natural Products in Plants by LC-MS. Revista Virtual de Química, v. 8, n. 1, p. 204–230.
- Nijveldt, R.J., 2001. “Flavonoids : A Review of Probable Mechanism of Action and Potential Applications.” Am J Clin Nutr 74: 418–25.
- Olaleye, M. T., Rocha, J. B. T., 2008. Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. Experimental and Toxicologic Pathology , v. 59, p. 319–327.
- Olaleye, M. T., Amobonye, A. E., Komolafe, K., Akinmoladun, A. C., 2014. Protective effects of Parinari curatellifolia flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 21, n. 5, p. 486–492.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N., 2014. “Quantitative Determination of Plant Phenolics in Urtica Dioica Extracts by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometric Detection.” Food chemistry 143: 48–53.
- Pereira, R. B., Sousa, C., Costa, A., Andrade, P.B., Valentão, P., 2013. “Glutathione and the Antioxidant Potential of Binary Mixtures with Flavonoids: Synergisms and Antagonisms.” Molecules 18(8): 8858–72.
- Pollard, S. E., Kuhnle, G. G. C., Vauzour, D., Vafeiadou, K., Tzounis, X., Whiteman, M., Rice-Evans, C., Spencer, J. P. E., 2006. “The Reaction of Flavonoid Metabolites with Peroxynitrite.” Biochemical and Biophysical Research Communications 350(4): 960–68.
- Puntel, R. L., Roos, D. H., Paixão, M. W., Braga, A. L., Zeni, G., Nogueira, C. W., 2007. “Oxalate Modulates Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) Production in Supernatants of Homogenates from Rat Brain, Liver and Kidney: Effect of Diphenyl Diselenide and Diphenyl Ditelluride.” Chemico-Biological Interactions 165(2): 87–98.
- Qiu, J. Y., Chen, X., Li, Z., Wang, S. R., Wu, X. W., Li, Y. J., Yang, D.Z., Yu, Y. Y., Yin, X. X., Tang, D. Q., 2015. “LC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of 11 Compounds of Ginkgo Biloba Extract in Lysates of Mesangial Cell Cultured by High Glucose.” Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 997: 122–28.
- Ramirez, G.; Zamilpa, A.; Zavala, M.; Perez, J.; Morales, D.; Tortoriello, J., 2016. Chrysoeriol and other polyphenols from Tecoma stans with lipase inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology, v. 185, p. 1–8.
- Ramos, M. F. S., Guimarães, A. C., Siani, A. C., 2003. Volatile monoterpenes from the oleoresin of *Trattinnickia rhoifolia*. Biochemical Systematics and Ecology, v. 31, n. 3, p. 309–311.
- Ramchoun, M.; Harnafi, H.; Alem, C.; Bücheleet B.; Simmet T.; Rouis M.; Atmani F.; Amrani S.; 2012. Hypolipidemic and antioxidant effect of polyphenol-rich extracts from Moroccan thyme varieties. e-SPEN Journal, v. 7, n. 3, p. 3–8.

- Roe, J.H., 1954. Methods of Biochemical Analysis, in: D Glick (Ed) Interscience 1, 115–139.
- Rosquete, C., Olmo, E. Del., Corral, J. M. M. Del., López, J.L., Gordaliza, M., Feliciano, A.S., 2010. Eudesmanolides and other terpenoids from *Trattinickia rhoifolia*. Avances en Química, v. 5, n. 2, p. 123–129.
- Salazar-Silvera, U. J. e Rosquete, C., 2010. Chemical constituents of the leaves from *Trattinickia rhoifolia*. Avances en Química, v. 5, n. 1, p. 63–65.
- Salgueiro, A. C. F., Folmer, V., Rosa, H. S. da, Costa, M;T., Boligon, A.A., Paula, F.R., Roos, D.H., Puntel, G.O., 2016. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of Achyrocline satureioides. Journal of Ethnopharmacology, v. 194, p. 6–14.
- Shanmugam, G., Ayyavu, M., Rao, D. M., Devarajan, T., Subramaniam, G., 2013. Hepatoprotective effect of caralluma umbellata against acetaminophen induced oxidative stress and liver damage in rat. Journal of Pharmacy Research, v. 6, n. 3, p. 342–345.
- Shanmugam, S., Thangaraj, P., Lima, B. dos S., Chandran, R., Souza de Araújo, A. A., Narain, N., Serafini, M. R., Júnior, L. J. Q., 2016. “Effects of Luteolin and Quercetin 3-β-D-Glucoside Identified from Passiflora Subpeltata Leaves against Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Rats.” Biomedicine & Pharmacotherapy 83: 1278–85.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H., 1968. Estimation of Total, Proteína-Bound, and Nonproteína Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman’s Reagent. Analytical Biochemistry, v. 25, p. 192–205.
- Sentellas, S., Morales-Ibanez, O., Zanuy, M., Albertí, J. J., 2014. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. Toxicology in Vitro, v. 28, n. 5, p. 1006–1015.
- Siani, A. C., S. Ribeiro, M. N. de, 1995. Podocarpusflavone A from the leaves of *Trattinnickia glaziovii*. Biochemical Systematics and Ecology, v. 23, n. 7–8, p. 879.
- Silva, M. H. DA, Rosa, E. J. F. Da, Carvalho, N. R. de, Dobrachinski, F., Rocha, J.B.T., Mauriz, J.L., Gonzalez-Gallego, J., Soares, F.A.A., 2012. Acute brain damage induced by acetaminophen in mice: Effect of diphenyl diselenide on oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Neurotoxicity Research, v. 21, n. 3, p. 334–344.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R., 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 1102 p.
- Singh, H., Atish, P., Kalia, A.N., Majeed, A. B. A., 2015. “Synergistic Hepatoprotective Potential of Ethanolic Extract of Solanum Xanthocarpum and Juniperus Communis against Paracetamol and Azithromycin Induced Liver Injury in Rats.” Journal of Traditional and Complementary Medicine: 1–7.
- Srinivasan, R., Chandrasekar, M. J. N., Nanjan, M. J., Suresh, B., 2007. “Antioxidant Activity of Caesalpinia Digyna Root.” Journal of Ethnopharmacology 113(2): 284–91.

- Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcenti, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355.
- Suke, S. G., Shukla, A., Mundhada, D., Banerjee, B. D., Mediratta, P. K., 2013. Effect of phosphamidon on cognition and oxidative stress and its modulation by ascorbic acid and 4'-chlorodiazepam in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 103, n. 3, p. 637–642.
- Tang, D., Yu, Y., Zheng, X., Wu, J., Li, Y., Wu, X., Du, Q., Yin, X., 2014. Comparative investigation of in vitro biotransformation of 14 components in *Ginkgo biloba* extract in normal, diabetes and diabetic nephropathy rat intestinal bacteria matrix. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 100, p. 1–10.
- Touati, R., Santos, S. A.O., Rocha, S. M., Belhamel, K., Silvestre, A. J.D., 2017. “Phenolic Composition and Biological Prospecting of Grains and Stems of Retama Sphaerocarpa.” *Industrial Crops and Products*, 95:244-255.
- Xie, J., Zhang, Y., Kong, D., Rexit, M., 2011. Rapid identification and determination of 11 polyphenols in *Herba lycopi* by HPLC-MS/MS with multiple reactions monitoring mode (MRM). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 7, p. 1069 –1072.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoproteína B of human low-density lipoproteínas. *Analytical Biochemistry*. 228, 349 – 351.
- Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of própolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37(2), 99-105.

ANEXO: Normas para publicação no Journal of Ethnopharmacology.

Normas para publicação no Journal of Ethnopharmacology

Introdução

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. Ethnopharmacological communications (formerly 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.

Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

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.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

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 or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), 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 CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, 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. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and 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 about this can be found here:<http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). 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 (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). 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: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

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.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open Access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse. An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

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 WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

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

Reference formatting

References in the manuscript should be given with the name of the first author (in case of 2 authors, both names, and in case of more first author et al.), and the year of publication, in the reference list any style or format can be used as long as the style is consistent. In the list all author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

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: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). 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 detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should 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.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. 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. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be 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.

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, 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. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

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.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865) More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

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 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.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of 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, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

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 printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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 on the Web (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 on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

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

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

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 encouraged.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

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 should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) 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.

Please use full journal names.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article.
Journal of Scientific Communication. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. The Elements of Style, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. 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.

When a web citation with a link is being used as a reference, the link should be checked, and that date reported with the link as "accessed on March 29, 2012": American Chemical Society. 2012. Ethical guidelines to publication of chemical research.<http://pubs.acs.org/userimages/ContentEditor/1218054468605/ethics.pdf>. Accessed on March 31, 2012.

Video data

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 files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. 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 at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. 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.

Audio Slides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

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
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- 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 Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.