

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

AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICO E ACETATO DE ETILA
DA CASCA DO CAULE DA *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae)
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PARACETAMOL
EM CAMUNDONGOS

DÉBORA LINSBINSKI PEREIRA

Sinop – Mato Grosso

Fevereiro, 2015

DÉBORA LINSBINSKI PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICO E ACETATO DE ETILA
DA CASCA DO CAULE DA *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae)
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PARACETAMOL
EM CAMUNDONGOS**

Orientador: Prof. Dr. Adilson Paulo Senhorin

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

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, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

L759a Linsbinski Pereira, Débora.

Avaliação dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos / Débora Linsbinski Pereira. –2015
xv, 57 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: 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, 2015.

Inclui bibliografia.

1.Plantas Medicinais. 2. Antioxidante. 3. Intoxicação Aguda. I.

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 EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP – CUS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS HUMANAS E SOCIAIS - ICNHS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS



FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos.

AUTOR: Débora Linsbinski Pereira

Dissertação defendida e aprovada em 19/02/2015.

Composição da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adilson Paulo Senhorin (Presidente Banca/ Orientador).
Universidade Federal de Mato Grosso – *Campus* de Sinop
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCAM

Prof. Dr. Valéria Dornelles Gindri Senhorin (Co-Orientadora)
Universidade Federal de Mato Grosso – *Campus* de Sinop
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - PPGCAM

Prof. Dr. Patricia da Costa Marisco (Membro Interno)
Universidade Federal de Mato Grosso - *Campus* de Sinop
Instituto de Ciências da Saúde

Prof. Dr. Pacífica Pinheiro Cavalcanti (Membro Interno)
Universidade Federal de Mato Grosso - *Campus* de Sinop
Instituto de Ciências da Saúde

Prof. Dr. Gabriela Piccolo Maitan Alfenas (Membro externo)
Faculdade de Sinop (FASIPE) – Sinop/MT

SINOPSE:

Estudou-se o estresse oxidativo causado pela intoxicação aguda por paracetamol e o potencial antioxidante dos extratos bruto etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, nos tecidos, hepático, renal e cerebral, bem como avaliação da toxicidade da planta.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Antioxidante, Intoxicação aguda.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nair Linsbinski Pereira e Orivaldo Pereira, pelo exemplo de vida, dignidade, perseverança e amor. Ao meu irmão Wanderlei Linsbinski Pereira pela força e companheirismo.

“ [...] todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e acima de tudo, com bom senso e sensibilidade“.

“ [...] não se curvem às críticas insensatas descomedidas, de pessoas que nem sempre têm a consciência do seu momento“.

“Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão, sempre, vencedores”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido alcançar mais esta vitória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop, juntamente com seus professores permanentes e colaboradores, à secretária e a todos os meus amigos da turma de 2013, em especial às minhas amigas, Tamara Zamadei, Janaina Cassins Osten e Fabiane Trevisan.

Ao professor Dr. Adilson Paulo Senhorin, que aceitou ser meu orientador, permitindo que todo um sonho fosse realizado, pela confiança e oportunidade.

À professora Dr^a. Valéria Dornelles Gindri Senhorin, pela confiança atribuída, oportunidade de poder desenvolver toda a minha pesquisa no laboratório de Bioquímica, pelas orientações e por ter me ajudado em todas as etapas da pesquisa.

A Ms. Ivani Kuntz Gonçalves da Universidade Federal de Viçosa, e ao Dr. Haroldo Cavalcante de Lima, do Jardim Botânico/Rio de Janeiro, pela realização da identificação botânica do espécime estudada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da minha bolsa, à Fundação de Amparo a Pesquisa de Mato Grosso, pelo suporte financeiro.

Às professoras Dr^a. Cássia Regina Primila Cardoso, Dr^a. Patricia da Costa Marisco e Dr^a. Nádia Aléssio Velloso, pela participação na banca de qualificação.

Às professoras Dr^a. Patricia da Costa Marisco, Dr^a. Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas, Dr^a. Pacifica Pinheiro Cavalcanti, pela participação da banca de defesa da dissertação.

À minha amiga Ana Paula Simões da Cunha, pela amizade e contribuição no desenvolvimento da pesquisa, pela ajuda nos experimentos, pelas longas horas que ficamos trabalhando, pelos feriados, domingos e longos períodos em que se dispôs para estar comigo no laboratório realizando as análises.

Ao meu amigo Esley Ribeiro Santos, pela amizade, pela ajuda no laboratório e, principalmente, por me animar quando eu estava triste com algum fato ocorrido durante essa minha longa jornada de trabalho.

À Hocelayne Paulino Fernandes, pela amizade e por ter contribuído com minha pesquisa, por tudo que me ensinou no laboratório de fitoquímica durante a fase de extração da casca da copaíba e análises fitoquímicas.

Às minhas amigas do laboratório de bioquímica, Larissa Scremin, Ana Júlia Pasuch, Danieli da Rocha e Luana Baldissera que me ajudaram no laboratório.

Ao meu amigo Valfran Lima, pelo companheirismo, por me socorrer nas horas difíceis, pela dedicação a tudo que faz e por me transmitir todo seu conhecimento e experiência no laboratório de bioquímica.

Aos meus amigos Rafael Marques dos Santos, Flávia Dockhorn Rodrigueus, Suzana Dockhorn, Daiton Luiz Araldi, Rafaelly Braz Nardino, Emília Chuina Tomazeli, Daniela Vennék e Ana Carolina Misturini pela colaboração com a pesquisa.

À minha amiga Lucinéia Albiero, pela amizade, companheirismo e pela contribuição com a pesquisa.

Ao meu pai, Orivaldo Pereira e aos meus amigos Nedina Rosa Nery, Francisco Aguera Lopes e Manoel Inocência de Sá, pela ajuda na coleta da casca da *Copaifera multijuga* Hayne.

Aos professores Dr. Gerardo Magela Vieira e Dr^a. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni, pela colaboração com a pesquisa e à técnica de laboratório Eriana Serpa Barreto.

RESUMO

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por espécies reativas do oxigênio (EROs) e espécies reativas do nitrogênio (ERN) provenientes do meio ambiente, geradas pelo próprio organismo ou por meio do contato com xenobióticos ou metabólitos tóxicos de fármacos, como por exemplo o paracetamol (PCM). O PCM é um analgésico amplamente usado pela população, no entanto, a superdosagem ou a intoxicação aguda leva a toxicidade. A toxicidade ocorre pela formação excessiva do N-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI), produto da metabolização do PCM, que causa depleção da glutathiona reduzida (GSH) e, conseqüentemente, estresse oxidativo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antioxidante exercido pelos extratos brutos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos *Swiss*. Os camundongos foram submetidos à intoxicação aguda com PCM (250 mg/Kg) e posteriormente tratados com os extratos etanólico e acetato de etila (EE ou EA, 250 mg/Kg, respectivamente) ou rutina (6 mg/Kg) via gavagem. Foram realizadas as análises de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma, proteínas carboniladas, peroxidação lipídica (produtos da reação com ácido tiobarbitúrico - TBARS) glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (ASA), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona-s-transferase (GST) do fígado, cérebro e rins. A CAT e GST hepáticas tiveram suas atividades diminuídas no grupo PCM em 22,8 % e 30,2 %, respectivamente. Neste mesmo grupo, houve um aumento de carbonilação de proteínas no tecido hepático (53,5 %), renal (71,3 %) e cérebro (28,5 %). Contudo houve uma diminuição da carbonilação no fígado, nos grupos tratados com PCM + EE (44,1 %) e nos rins os grupos tratados com PCM + EA, PCM + Rutina, diminuíram a carbonilação de proteínas em 50,7 % e 30,4 %, respectivamente. A GSH hepática diminuiu (22,8 %) no grupo PCM e os animais tratados com PCM + EE tiveram um aumento de 35%. Além disso, foi evidenciado um aumento das aminotransferases ALT (25,8%) e AST (64,5 %) no plasma, e os grupos tratados com PCM + Rutina, PCM + EE e PCM + EA tiveram uma diminuição da ALT em 35 %, 21,7 %, 28,6 %, respectivamente. Já a AST diminuiu 55,9 % somente no grupo PCM + Rutina. Os extratos apresentaram um efeito positivo sobre os antioxidantes não enzimáticos GSH e ASA, pois foram capazes de restabelecer os níveis destes parâmetros alterados pelo PCM. O melhor efeito antioxidante no modelo de estresse oxidativo induzido por PCM deu-se ao EE, devido ao alto teor de compostos fenólicos presentes, demonstrado pelas análises de DPPH e concentração de fenóis totais.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; Antioxidante; Intoxicação Aguda

ABSTRACT

The human organism is subject to the oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) from the environment, generated by the organism itself or through contact with xenobiotics or toxic metabolites of drugs, such as paracetamol (PCM). PCM is an analgesic widely used by the population, however, overdosage or intoxication leads to severe toxicity. The toxicity occurs by the formation of excessive N-acetyl-*p*-benzoquinoneimine (NAPQI), the product of this metabolism, which causes depletion of reduced glutathione (GSH) and hence oxidative stress. The aim of this work was to evaluate the antioxidant effect exerted by the ethanolic and ethyl acetate crude extract from the stem bark of the *Copaifera multijuga* on oxidative stress induced by paracetamol in Swiss mice. The mice were subjected to acute poisoning with PCM (250 mg/kg) and then treated with ethanolic and ethyl acetate extracts (EE and EA, 250 mg/kg) or rutin (6 mg/kg) by gavage. It was analysed alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in plasma, protein carbonyls, lipid peroxidation (reaction products with thiobarbituric acid - TBARS), reduced glutathione (GSH), ascorbic acid (ASA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) of tissues (liver, brain and kidney). CAT and GST in the hepatic tissue had their diminished activity in the PCM group in 22.8 % and 30.2 %, respectively. In this group, there was an increase of protein carbonyls in the liver (53.5 %), renal (71.3 %) and brain (28.5%). However, there was a decrease in the carbonylation in the groups treated PCM + EE (44,1 %) in the liver and PCM + EA, PCM + Rutina in the kidneys about 50,7 % e 30,4 %, respectively. Hepatic GSH decreased (22.8%) in the PCM group and the animals treated with PCM + EE increased by 35%. Furthermore, it was shown an increase in ALT (25.8%) and AST (64.5%) aminotransferases in the plasma and PCM + Rutin, PCM + EE and PCM + EA groups had a decrease of 35%, 21.7%, 28.6%, respectively. In addition, AST decreased 55.9% only in PCM + Rutin group. However, the extracts showed a positive effect on the non-enzymatic antioxidants GSH and ASA, as they were able to restore the levels of these parameters changed by the PCM. The best antioxidant effect on oxidative stress induced model PCM gave to the EE, due to the high content of phenolic compounds shown by analysis of DPPH and total phenols concentration.

Keywords: Medicinal Plants; Antioxidant; Acute Intoxication

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO I.....	10
Resumo	11
1. Introdução	12
2. Material e métodos.....	13
2.1. Reagentes.....	13
2.2. Coleta e identificação botânica.....	14
2.3. Preparo do extrato.....	14
2.4. Determinação de fenóis e flavonoides totais	15
2.5. Determinação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH).....	15
2.6. Animais e tratamento.....	16
2.7. Análises bioquímicas	17
2.7.1. Avaliação das atividades antioxidantes enzimáticas	17
2.7.2. Avaliação das atividades antioxidantes não enzimáticas	18
2.7.3. Marcadores de estresse oxidativo.....	19
2.7.4. Análise dos marcadores de dano hepático e parâmetros metabólicos do plasma ..	20
2.8. Análise estatística	20
3. Resultados.....	20
3.1. Fenóis totais, flavonoides totais e DPPH	20
3.2. Análise de marcadores de dano e do estresse oxidativo no tecido hepático e plasma	21
3.3. Análise de marcadores do estresse oxidativo no tecido renal	23
3.4. Análise de marcadores do estresse oxidativo no tecido cerebral.....	24
4. Discussão.....	25
Conclusão	29

Referências30

ANEXO A: Normas para publicação no Journal of Ethnopharmacology..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

AlCl₃: cloreto de alumínio;
ALT: alanina aminotransferase;
ASA: ácido ascórbico;
AST: aspartato aminotransferase;
CARBONIL: proteínas carboniladas;
CAT: catalase;
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno;
CEPA: comitê de ética em pesquisa animal;
CE₅₀: concentração eficiente para sequestrar 50% do DPPH inicial;
DNA: ácido desoxirribonucleico;
DNPH: 2,4 dinitrofenil-hidrazina;
DPPH: 1,1-difenil-2-picril hidrazila;
DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico);
EA: extrato acetato de etila;
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;
EE: extrato etanólico;
GSH: glutationa reduzida;
GST: glutationa-s-transferase;
HCl: ácido clorídrico;
H₂O₂: peróxido de hidrogênio;
MDA: malondialdeído;
NAPQI: N-acetil-*p*-benzoquinonaimina;
PBS: tampão fosfato-salino;
PCM: paracetamol;
RL: radical livre;
RNA: ácido ribonucleico;
RNS: espécies reativas do nitrogênio;
ROS: espécies reativas do oxigênio;
SDS: dodecil sulfato de sódio;
SINITOX: sistema nacional de informações tóxico-farmacológico;
SOD: superóxido dismutase;
TBA: ácido 2-tiobarbitúrico;

TBARS: produtos da reação com ácido tiobarbitúrico;

TCA: ácido tricloroacético;

TFK: tampão fosfato de potássio;

TRIS: tris amino metano.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais, assim como a fitoterapia, fazem parte da chamada Medicina Tradicional, a qual se refere aos “conhecimentos, habilidades e práticas, baseadas nas teorias, crenças e experiências das mais variadas culturas. São usadas na manutenção da saúde, prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais”. Podendo, ainda, ser chamado de Medicina Complementar (BRASIL, 2006), na qual é imprescindível o reconhecimento e a valorização dessas práticas como elementos para a promoção da saúde, conforme preconiza a Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2007).

A busca pela utilização de plantas a partir de conhecimento empírico já existente tem contribuído não só para a terapia complementar, como também para o direcionamento de estudos fitoquímicos e de atividade biológica, como toxicidade, propriedade antiinflamatória e atividade antioxidante. As plantas medicinais, por terem ações terapêuticas popularmente conhecidas, necessitam ser posteriormente comprovadas cientificamente (BRASILEIRO et al., 2008; OLIVEIRA; MENINI NETO, 2012).

Os antioxidantes provenientes das plantas contribuem para a prevenção e recuperação de danos causados ao organismo. Essa atividade antioxidante pode ser atribuída principalmente aos compostos fenólicos e flavonoides, os quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização dos radicais livres, pois bloqueiam estas moléculas que apresentam grande poder de oxidação (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

O radical livre (RL) é uma estrutura química altamente instável e reativa. Isso se apresenta devido à ocorrência de um elétron desemparelhado, que ocupa um orbital atômico ou molecular sozinho (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). São provenientes do oxigênio ou nitrogênio (BIANCHI; ANTUNES, 1999), formados pela perda ou adição de um elétron a um composto não radicalar. Em geral, essas espécies têm uma meia-vida muito curta (podendo variar desde nanosegundos há alguns minutos) (ALBDALLA; FAINE, 2008) e são capazes de causar danos irreversíveis, quando não bloqueadas pelo sistema de defesa antioxidante.

O radical livre tem como alvo as biomoléculas que compõem membranas celulares, proteínas, DNA e RNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (BARBOSA et al., 2010). Quando esses radicais livres são gerados em excesso por produtos

químicos, processos patológicos, radiação ultravioleta, cigarro, solventes orgânicos, herbicidas e uso de paracetamol em altas doses, podem gerar o estresse oxidativo.

O PCM é um analgésico amplamente usado pela população, sendo um fármaco seguro em doses terapêuticas. No entanto, a superdosagem pode causar toxicidade severa (GREGUS, 2012). O PCM, normalmente sofre glicuronidação e sulfatação a seus conjugados correspondentes, que juntos, compõem 95% do total de metabólitos excretados. A via de conjugação alternativa, que utiliza a glutathiona reduzida (GSH) e depende do citocromo P450, dá conta dos 5% restantes. Quando a ingestão de PCM excede as doses terapêuticas, as vias de glicuronidação e sulfatação ficam saturadas e a via dependente do citocromo P450 se torna muito importante (CORREIA, 2014). Assim, o efeito hepatotóxico do PCM, em altas doses, está associado a sua metabolização e a formação excessiva do metabólico tóxico N-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI) (KISAUGLU et al., 2014), que gera estresse oxidativo.

A instalação do estresse oxidativo se dá por meio de um desequilíbrio celular entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, sendo que o fator oxidante predomina nesse mecanismo, resultando em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade das células, tecidos e órgãos (AUGUSTO, 2006; ALBDALLA; FAINE, 2008; BARBOSA et al., 2010).

Os antioxidantes podem ser definidos como uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparativamente às de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Da mesma forma como retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). O aumento dessas defesas antioxidantes poderia diminuir o dano oxidativo e, quem sabe prevenir doenças (AUGUSTO, 2006).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são sistemas de defesa contra os radicais livres. Essas enzimas são de extrema importância para os tecidos, pois previnem o estresse oxidativo e são compostas por enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona-*s*-transferase (GST) (BORELLA; VARELA, 2004; ALBDALLA; FAINE, 2008).

Os antioxidantes não enzimáticos são constituídos por tocoferóis (vitamina E), carotenoides, polifenóis (como taninos e flavonoides), ácido ascórbico, glutathiona e antioxidantes de baixo peso molecular, como por exemplo, bilirrubina, melatonina, ácido úrico e ácido lipoico (SPADA; SILVA, 2004; ALBDALLA; FAINE, 2008).

Os polifenóis de plantas são compostos aromáticos hidroxilados e são sintetizados pelas plantas como defesa antioxidante da mesma. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm revelado inúmeras atividades biológicas (ALBDALLA; FAINE, 2008). Por isso, avaliar o potencial terapêutico de plantas medicinais quanto à atividade antioxidante, tem sido objeto de incessantes estudos, na busca de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), como terapia complementar no tratamento de doenças, como por exemplo, o uso do óleo-resina da copaíba pela população.

A *Copaifera sp.* (Fabaceae) é comumente utilizada pela população e é conhecida popularmente como “copaíba”, “copaiva” ou “pau-de-óleo” (PAIVA et al., 2004). Estão descritos na literatura 72 espécies, sendo 16 delas encontradas exclusivamente no Brasil. Entre as espécies mais abundantes pode-se destacar: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriocea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

O óleo-resina da *Copaifera sp.*, é utilizado pela população da Região Amazônica no tratamento de várias doenças inflamatórias que envolvem as vias aéreas (tais como asma, dor de garganta e bronquite), doenças do aparelho geniturinário e da pele (feridas, eczema e herpes) (GELMINI et al., 2013).

O óleo-resina é amplamente estudado e diversas pesquisas indicam atividades como: antifúngica (DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011), anti-inflamatória e antinociceptiva (GOMES et al., 2007; VEIGA JUNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2010; GELMINI et al., 2013), antitumoral (LIMA et al., 2003; GOMES et al., 2008), cicatrização celular *in vitro* (NOGUEIRA et al., 2012) e antimicrobiana (VASCONCELOS et al., 2008; PIERI et al., 2012).

Além do óleo-resina, a casca do caule da copaíba também é utilizada pela população, na forma de decocção, para diversas afecções, tais como, inflamação da próstata, bexiga, garganta, secreção vaginal, inflamação uterina e ferida no colo do útero (BRASIL, 2009). No entanto são limitadas às informações referentes às atividades farmacológicas e antioxidantes da casca do caule da *Copaifera sp.*, embora esteja descrito na literatura um estudo realizado com o extrato metanólico das cascas de *C. reticulata*, que foi capaz de atuar como antioxidante para redução de danos ao DNA induzido por radicais livres

(DESMARCHELIER; COUSSIO; CICCIA, 1997). Contudo, mesmo a casca sendo usada pela população, não há estudos que descrevam se a casca do caule de *Copaifera multijuga* Hayne apresenta propriedades antioxidantes ou alguma toxicidade. Por isso, este estudo justifica-se pela necessidade de saber se a planta apresenta propriedades benéficas contra o estresse oxidativo induzido por paracetamol.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito antioxidante exercido pelos extratos brutos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos *Swiss*.

Objetivos específicos

- Coletar a casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne;
- Identificar a espécie;
- Realizar a extração dos constituintes químicos da casca do caule, com os solventes hexano, acetato de etila e álcool etílico;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos bruto etanólico e acetato de etila;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* com o radical 1,1-difenil-2-picril hidrazila (DPPH);
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST (no fígado) e CAT (fígado, rim e cérebro) dos camundongos;
- Avaliar os parâmetros antioxidantes não enzimáticos GSH (fígado, rim e cérebro) e ASA (fígado e cérebro) dos camundongos;
- Analisar os marcadores do estresse oxidativo CARBONIL (fígado, rim e cérebro) e TBARS (fígado) dos camundongos;
- Verificar a toxicidade dos extratos pelas dosagens de AST e ALT no plasma dos camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Org.). *Fundamentos de toxicologia*. 3ª ed. Atheneu: São Paulo, 2008. cap.1.4, p.38-58.

AUGUSTO, O. **Radicaís livres: bons, maus e naturais**. 1ª ed. Oficina textos: São Paulo, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**. v.29, p. 113-123, 2006.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, DF. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico**. Brasília, DF., v.1, p.1-140, 2007.

BRASIL. Fundação Vitória Amazônia. **O uso de plantas medicinais no parque Nacional do Jaú**. Criado em: 29/07/2009. Disponível em: < <http://www.fva.org.br> >. Acesso em: 30 nov. 2013.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLLO, V. R.; MATOS, D. S., GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Bras. Cien. Farm.**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

BORELLA, M. L. L.; VARELA, Q. D. Antioxidantes enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. 1 ed. ULBRA: Canoas, 2004, cap.2, p.35-47.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação para otimização da atividade. **Quím. Nova**. v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CORREIA, M. A. Biotransformação de fármacos. In: Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A. J. (Org.). **Farmacologia básica e clínica**. 12^a ed. Artmed: Porto Alegre, 2014, cap. 4, p. 53-68.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Extracts of Bolivian plants, *Copaifera reticulata* and *Heisteria pallida* Inhibit *in vitro* Free Radical-mediated DNA Damage. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 460-462, 1997.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Rev. Bras. Plant. Med.**, v.13, n.1, p.1-7, 2011.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary *in vivo* evaluation of its antipsoriatic effect. **Inter. Pharm.**, v. 440, p. 170-178, 2013.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Ethnopharmacol.**, v. 109, p.486-492, 2007.

GOMES, N.M., REZENDE, C.M, FONTES, S.P., HOVELL, A.M.C., LANDGRAF, R.G., MATHEUS, M.E., PINTO, A.C., FERNANDES, P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera*

multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Ethnopharmacol.*, v. 119, p. 179-184, 2008.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. ***Ethnopharmacol.***, v. 128, p. 177-183, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. ***Free Rad. Biol. Med.***, New York, v.18, p.125-126, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. ***Free radicals in biology and medicine.*** 3^o ed. Oxford: New York, 2000.

GREGUS, Z. Mecanismos de toxicidade. In: KLAASSEN, D; WATKINS, J. B. (Org). ***Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull.*** 2^o ed.-Porto Alegre: Artmed, 2012, cap.3, p. 20-46.

LIMA, S. R. M.; VEIGA JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A.; FERNANDES, P. D. *In vivo* and *in vitro* Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. ***Res. Phytother.*** v. 17, p. 1048-1053, 2003.

NOGUEIRA, E. O.; NOVAES, A. S. M.; SANCHEZ, C. M. S.; ANDRADE, C. M.; SILVA, M. F. A. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na proliferação celular *in vitro*. ***Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.***, v. 49, n. 4, p. 293-300, 2012

OLIVEIRA, E.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte - MG. ***Ver. Bras. Plant. Med.***, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

PAIVA, L.A.F., GURGEL, L.A., SOUSA, E.T., SILVEIRA, E.R., SILVA, R.M., SANTOS, F.A., RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. ***Ethnopharmacol.***,v. 93, p. 51-56, 2004.

PIERI, F.A.; SILVA, V. O.; SOUZA, C. F.; COSTA, J. C. M.; SANTOS, L. F.; MOREIRA, M. A. S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 1, p. 241-244, 2012.

SPADA, P. K. W. D.; SILVA, C. O. Antioxidantes não enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HEMRIQUES, J. A. P. (Org). *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas: Ulbra, 2004, p. 51-67.

VASCONCELOS, K. R. F.; VEIGA JUNIOR, V. F. ROCHA, W. C.; BANDEIRA, M. F. C. L. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Braz J. Pharmacogn.** v. 18, p. 733-738, 2008.

VEIGA, JUNIOR. V. F.; PINTO, A. C. O genero *Copaifera* L. **Quím. Nova.** v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne- A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 248-254, 2007.

CAPÍTULO I

Avaliação dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos

Artigo a ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Avaliação dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos

Débora Linsbinski Pereira^a, Ana Paula Simões da Cunha^a, Valéria Dornelles Gindri Senhorin^a, Adilson Paulo Senhorin^b

^aLaboratórios Integrados de Pesquisas em Química (LIPEQ), Laboratório de Bioquímica, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop, Mato Grosso, Brasil

^bLaboratórios Integrados de Pesquisas em Química (LIPEQ), Laboratório de Fitoquímica, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop, Mato Grosso, Brasil

Resumo

O paracetamol (PCM) é um analgésico amplamente utilizado pela população, sendo seguro em doses terapêuticas. A intoxicação aguda por PCM causa estresse oxidativo, devido à formação em excesso do metabólito tóxico N-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antioxidante exercido pelo extrato da casca do caule da *Copaifera multijuga* sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos. Os camundongos foram submetidos à intoxicação aguda com PCM (250 mg/Kg) e posteriormente tratados com os extratos etanólico e acetato de etila (EE ou EA, 250 mg/Kg, respectivamente) ou rutina (6 mg/Kg) via gavagem. Foram realizadas as análises de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma, proteínas carboniladas, peroxidação lipídica (produtos da reação com ácido tiobarbitúrico - TBARS) glutaciona reduzida (GSH), ácido ascórbico (ASA), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutaciona-s-transferase (GST) do fígado, cérebro e rins. A CAT e GST hepáticas tiveram suas atividades diminuídas no grupo PCM em 22,8 % e 30,2 %, respectivamente. Neste mesmo grupo, houve um aumento de carbonilação de proteínas no tecido hepático (53,5 %), renal (71,3 %) e cérebro (28,5 %). Contudo houve uma diminuição da carbonilação no fígado, nos grupos tratados com PCM + EE (44,1 %) e nos rins os grupos tratados com PCM + EA, PCM + Rutina, diminuíram a carbonilação de proteínas em 50,7 % e 30,4 %, respectivamente. A GSH hepática diminuiu (22,8 %) no grupo PCM e os animais tratados com PCM + EE tiveram um aumento de 35%. Além disso, foi evidenciado um aumento das aminotransferases ALT (25,8%) e AST (64,5 %) no plasma, e os grupos tratados com PCM + Rutina, PCM + EE e PCM + EA tiveram uma diminuição da ALT em 35 %, 21,7 %, 28,6 %, respectivamente. Já a AST diminuiu 55,9 % somente no grupo PCM + Rutina. Os extratos apresentaram um efeito positivo sobre os antioxidantes não enzimáticos GSH e ASA, pois

foram capazes de restabelecer os níveis destes parâmetros alterados pelo PCM. O melhor efeito antioxidante no modelo de estresse oxidativo induzido por PCM deu-se ao EE, devido ao alto teor de compostos fenólicos presentes, demonstrado pelas análises de DPPH e concentração de fenóis totais.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Antioxidante; Intoxicação aguda; Fígado

1. Introdução

No Brasil, é comum a intoxicação por medicamentos e, de acordo com o sistema nacional de informações tóxico farmacológico (SINITOX), os medicamentos são os principais causadores de intoxicação em seres humanos (Brasil, 2011) e isto se deve principalmente a automedicação e à falta de conhecimento da população.

O Paracetamol (PCM) é um analgésico e antipirético, amplamente usado pela população, sendo um fármaco seguro em doses terapêuticas. No entanto, a superdosagem pode causar toxicidade e necrose centrolobular no fígado (James et al., 2003; Hinson et al., 2010). Isso ocorre quando os mecanismos de proteção natural não são suficientes, resultando em dano hepático (Setty, 2007). O efeito hepatotóxico do PCM em altas doses está associado ao seu metabólito tóxico N-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI) que gera estresse oxidativo (Olaleye e Rocha, 2008; Kisaoglu et al., 2014), necrose hepática e perda de função do órgão.

Os oxidantes e radicais livres intermedeiam, desde circuitos de sinalização fisiológicos e patológicos até lesões a constituintes celulares (Augusto, 2006). Entretanto, o organismo é protegido por sistemas de defesa antioxidante de origem endógena ou exógena, obtido de plantas medicinais e alimentos, como os compostos fenólicos, betacaroteno e o ácido ascórbico, que previnem o dano oxidativo gerado pelos radicais livres.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades redutoras, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (Degáspari e Waszczynskyj, 2004), exercendo um efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por NAPQI.

No entanto, o uso terapêutico dessas plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos estão intrinsecamente relacionados aos territórios e seus respectivos recursos naturais. São amplamente utilizadas pela população, e fazem parte da chamada Medicina Complementar (Brasil, 2007). No entanto, a busca do conhecimento empírico sobre as plantas podem fornecer informações úteis na elaboração de pesquisas farmacológicas e fitoquímicas

(Brasileiro et al., 2008) e o uso terapêutico de plantas medicinais podem funcionar como ferramenta de baixo custo econômico e eficaz no atendimento as necessidades da população (Lima et al., 2014), desde que comprovada cientificamente a sua eficácia, pois determinadas plantas medicinais utilizadas pela população podem gerar efeitos benéficos ou até mesmo efeitos tóxicos.

A *Copaifera sp.* (Fabaceae) é comumente utilizado pela população e é conhecida popularmente como “copaíba”, “copaiva” ou “pau-de-óleo” (Paiva et al., 2004). Estão descritas na literatura 72 espécies, sendo 16 delas encontradas exclusivamente no Brasil (Veiga Junior e Pinto, 2002).

O óleo-resina da copaíba é utilizado pela população para diversas afecções, e estão descritos na literatura diversas pesquisas sobre atividade anti-inflamatória (Veiga Junior et al., 2007; Gelmini et al., 2013; Paiva 2014; Gomes et al., 2010), atividade analgésica tópica (Carvalho et al. 2005), antifúngica (Deus et al., 2011), antibacteriana (Vasconcelos et al., 2008; Pieri et al., 2012), antinociceptiva (Gomes et al., 2007), antitumoral (Lima et al., 2003; Gomes et al., 2008) e cicatrização celular *in vitro* (Nogueira et al., 2012).

A casca da copaíba é utilizada pela população para o tratamento de inflamação da próstata, bexiga, garganta, secreção vaginal, inflamação uterina e ferida no colo do útero (Brasil, 2009). Uma vez que a planta é utilizada pela população para processos inflamatórios, é provável que a casca do caule possa apresentar atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido por PCM. Assim, a pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante exercido pelos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne sobre o estresse oxidativo induzido por paracetamol em camundongos.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Albumina de soro bovino, Triton X-100, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido 5,5'-dítio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB), 2,4 dinitrofenil-hidrazina (DNPH), reagente de Bradford, ácido tricloroacético (TCA), 1,1-difenil-2-picril hidrazila (DPPH), fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA),

trisaminometano (TRIS), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), Tween 80, Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio (AlCl_3), ácido gálico, quercetina e ácido ascórbico foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich® (St. Louis, United States of America) e com alto grau de pureza (95-99 %). Todos os solventes utilizados para o preparo dos extratos eram P.A. e adquiridos da Merck® (Darmstadt, Alemanha).

Os kits para dosagem de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram adquiridos da Labtest®, Diagnóstico S. A., Minas Gerais, Brasil.

2.2. Coleta e identificação botânica

As cascas do caule da *Copaifera multijuga* Hayne foram coletadas na cidade de Guarantã do Norte – Mato Grosso, Brasil, sob as coordenadas geográficas S 9°48' 31.0'' W 54°53' 18.0''. A espécime foi identificada pela Ms. Ivani Kuntz Gonçalves da Universidade Federal de Viçosa e Dr. Haroldo Cavalcante de Lima do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A exsicata foi depositada na coleção do Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus* Universitário de Sinop-MT, Brasil sob o número de registro 4801.

2.3. Preparo do extrato

As cascas foram secas em estufa com ventilação forçada, à temperatura média de 40 °C durante sete dias. Após a secagem e trituração, a extração dos constituintes químicos foi realizada com 1,26 Kg do material vegetal com adição de 2 litros de solvente em cada extração.

O processo de extração ocorreu em três etapas: na primeira etapa foram realizadas 2 extrações com hexano; na segunda etapa (mesmo material vegetal) foram realizadas 2 extrações com acetato de etila e na terceira extração (mesmo material vegetal), foram realizadas 9 extrações com álcool etílico absoluto.

Em cada processo de extração o material vegetal permaneceu em repouso e ao abrigo da luz durante sete dias. Na sequência, os extratos foram filtrados separadamente, resultando nos extratos brutos hexano, acetato de etila e álcool etílico.

Para concentração dos extratos e retirada dos solventes, foi utilizado evaporador rotativo com temperatura média do banho termostático de 40 °C e sob pressão reduzida de 600 mmHg. O rendimento final dos extratos brutos seco foi de 1,65 g para o extrato hexânico,

5,15 g para o extrato acetato de etila e 220,46 g para o extrato etanólico. Para a realização dos ensaios foram utilizados somente os extratos brutos etanólico (EE) e acetato de etila (EA), pois o objetivo foi utilizar os extratos na qual os solventes extraíram maior quantidade de moléculas polares.

2.4. Determinação de fenóis e flavonoides totais

A quantidade de fenóis totais nos EA e EE foi determinada através da reação de Folin-Ciocalteu, de acordo com Rio, (1996). A curva de calibração com ácido gálico foi feita com as concentrações de 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4 $\mu\text{g/mL}$, 4 mL do reagente Folin-Ciocalteu (2 N) e 6 mL de carbonato de sódio a 20 % em 50 mL de água destilada. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $A = 0,114.C + 0,005$ onde A é a absorbância da amostra e C é a concentração do ácido gálico, e o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,995.

Para a avaliação das amostras, os EE e o EA foram preparados em soluções metanólica de 500 $\mu\text{g/mL}$. Adicionou-se uma alíquota de 0,375 mL da amostra, 4 mL do reagente Folin-Ciocalteu (2 N) e 6 mL de carbonato de sódio a 20 % em 50 mL de água destilada. Após 2 horas de reação, realizou-se leitura em espectrofotômetro a 760 nm. O resultado foi comparado a curva de calibração e expresso em mg de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

A quantidade de flavonoides totais nos EA e EE foi determinada através da reação com cloreto de alumínio (AlCl_3) de acordo com Rio (1996), com adaptações na curva de calibração. Construiu-se uma curva de calibração utilizando-se solução metanólica de quercetina em concentrações de 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,5; 3; 3,5; 4 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$, e para cada concentração foi adicionado 1 mL de solução metanólica de AlCl_3 (50 mg/mL). A equação da curva de calibração com quercetina foi de: $A = 0,069.C - 0,004$ onde A é a absorbância da amostra e C é a concentração da quercetina, e o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,998.

Para a avaliação das amostras EA e EE, foram utilizadas concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato e adicionou-se 1 mL de AlCl_3 (50 mg/mL). Após 30 minutos de reação, realizou-se leitura em espectrofotômetro a 420 nm. O resultado foi comparado a curva de calibração e expresso em mg de equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g).

2.5. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* (DPPH)

Na avaliação do potencial antioxidante foi seguida a metodologia de Sousa et al. (2007), com adaptações. Foi realizado o monitoramento do consumo do radical livre DPPH[·] pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações, lidas no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 515 nm.

Foi realizada uma curva de calibração com DPPH[·] nas concentrações de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 µg/mL. A partir da equação da curva de calibração do DPPH[·] ($A = 0,028.C - 0,004$, coeficiente de correlação $R^2 = 1$) e dos valores de absorvância para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH[·] remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a equação: $\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T=t}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}} \times 100$. Onde $[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}$ corresponde à concentração de DPPH[·] no meio, após a reação com o extrato e $[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}$ é a concentração inicial de DPPH[·], ou seja, 40 µg/mL.

Os padrões rutina e ácido ascórbico, bem como as amostras, EA e EE foram diluídos em metanol nas concentrações de 25; 50; 100; 150; 200 e 250 µg/mL. Uma alíquota de 0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH[·] (40 µg/mL) foram lidas no espectrofotômetro após 30 minutos de reação. Foi usado como branco metanol (2,7 mL) e 0,3 mL de solução metanólica do extrato.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para sequestrar 50 % do DPPH[·] inicial (CE50) foi determinada a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, onde foram colocados no eixo da abscissa, as concentrações da amostra (µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH[·] remanescente (% DPPH_{REM}).

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas das amostras (EE e EA) e os padrões (rutina e ácido ascórbico) foram convertidos em porcentagem de potencial antioxidante (PA), determinada pela Equação: $\% \text{ PA} = \{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})] \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$. Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH[·] e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH[·]+amostra).

2.6. Animais e tratamento

Camundongos *Swiss* machos, com peso médio de 33,4 g, foram obtidos do Biotério da Universidade de Mato Grosso, *Campus* de Cuiabá. Os animais foram divididos em 8 grupos de 8 animais e foram aclimatados por 20 dias com controle de fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, temperatura de 24 ± 1 °C, umidade relativa de 51 ± 2 %, ração e água filtrada em livre demanda.

Após o período de aclimação os grupos foram submetidos aos seguintes tratamentos por via oral: Grupo 1- Controle negativo (água); Grupo 2 - Rutina (antioxidante, 6 mg/Kg); Grupo 3 – paracetamol (PCM, controle positivo: 250 mg/Kg, o qual foi preparado em água à 37°C); Grupo 4 - PCM + Rutina; Grupo 5 - PCM + EE; Grupo 6 - PCM + EA; Grupo 7 - EE (250 mg/Kg); Grupo 8 - EA (250 mg/Kg).

A dose selecionada do PCM (250 mg/Kg), bem como o protocolo de indução da lesão foi segundo Olaleye e Rocha (2008) e a dosagem da rutina (6 mg/Kg) utilizada foi segundo Carbonari (2005).

O experimento iniciou-se com a indução da lesão com PCM; 250 mg/Kg nos grupos G3, G4, G5 e G6, os demais grupos receberam somente água (G1, G2, G7 e G8). Após 3 horas da indução da lesão, o grupos G2, G4, G5, G6, G7 e G8, receberam a primeira dose de rutina (6 mg/Kg + Tween 0,01 %) ou do extrato EE ou EA (250 mg/Kg + Tween 0,01 %) e os grupos G1 e G3, receberam água + Tween 0,01 %. No período de tratamento de 7 dias, os grupos tratamento receberam os extratos ou rutina, e os grupos controle (G1 e G3) receberam água + Tween 0,01 % uma vez ao dia.

Depois de 24 horas da última dose dos tratamentos, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com ketamina 50 mg/Kg, xilaxina 2 mg/Kg e acepromazina 2 mg/kg. Foi realizada punção cardíaca para a coleta de sangue com seringas contendo heparina sódica 5.000 UI/mL e, após esta etapa, os animais foram sacrificados para a retirada do fígado, rins e cérebro. As amostras foram congeladas a -85°C. Esta pesquisa foi certificada conforme protocolo n° 23108.781869/12-0 do comitê de ética em pesquisa animal (CEPA), UFMT/Cuiabá.

2.7. Análises bioquímicas

2.7.1. Avaliação das atividades antioxidantes enzimáticas

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida segundo Misra e Fridovich (1972). O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM (pH 7,8) 1:20 g/mL, centrifugado a 10.000 g a 4 °C por 20 min, e após este procedimento foi retirado o sobrenadante e mensurado a atividade da enzima em modo cinético em 480 nm usando o espectrofotômetro UV-VIS, onde no meio reacional continha tampão glicina 50 mM (pH 10,5) a 26 °C no volume de 1,98 mL, 1,95 mL ou 1,90 mL e o sobrenadante (amostra)

0,020 mL, 0,050 mL ou 0,100 mL respectivamente, por último foi adicionado 0,034 mL de bitartarato de adrenalina 60 mM. O resultado foi expressa $U.L^{-1}$ SOD.mg de proteína⁻¹.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada segundo Nelson e Kiesow (1972), no fígado, cérebro e rim. As amostras foram homogeneizadas com TFK 20 mM (pH 7,5), triton X-100 0,1 % e NaCl 0,15 M, nas diluições 1:30, 1:20 e 1:10 g/mL, para o fígado cérebro e rins, respectivamente. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C e após este procedimento, foi retirado o sobrenadante. Para o ensaio obteve-se uma mistura contendo 1,0 mL de TFK 50 mM (pH 7,0), 0,025 mL do do sobrenadante e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio a 0,3 M. A mudança da absorbância do H₂O₂ em 60 segundos foi medida em espectrofotômetro a 240 nm e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$.

A atividade da glutathiona-s-transferase (GST) no fígado, foi determinada de acordo com Habig et al. (1974). O tecido foi homogeneizado em TFK 20 mM (pH 7,5) na diluição 1:20 g/mL e centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C, e posteriormente retirado o sobrenadante. O 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (0,15 mL) foi usado como substrato e adicionado à mistura contendo 2,5 mL de TFK 20 mM (pH 6,5), 0,30 mL de GSH 10 mM e 0,050 mL do sobrenadante. A formação de S-2,4-dinitrofenil glutathiona foi monitorada através do aumento da absorbância em 340 nm contra o branco (tampão e outros reagentes usados para medir a atividade da enzima na ausência da amostra) em intervalos de 10 em 10 segundos por 1 minuto. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol GS-DNB.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$. O coeficiente de extinção molar usado para o CDNB foi de 9.6 mM.cm^{-1} .

O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (1976) usando albumina bovina como padrão para construção da curva de calibração e as amostras foram lidas em 595 nm.

2.7.2. Avaliação das atividades antioxidantes não enzimáticas

A glutathiona reduzida (GSH) foi dosada pelo método de Sedlack e Lindsay (1968), sendo o seu conteúdo expresso em $\mu\text{mol GSH.mg proteína}^{-1}$. Fígado, cérebro e rins foram homogeneizados em EDTA 20 mM nas diluições 1:40, 1:20 e 1:40 g/mL, respectivamente. Para o fígado e rim uma alíquota de 2,0 mL do homogeneizado foi misturada com 1,6 mL de água ultra pura e 0,4 mL em TCA 50 %, centrifugado a 4000 g por 15 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com o cérebro, porém foi usado 1,5 mL do homogeneizado, 1,2 mL de água ultra pura e 0,3 mL de TCA. Após centrifugação, uma alíquota de 1 mL do

sobrenadante foi adicionada a 2 mL de Tris 0,4 M/HCl (pH 8,9), na qual adicionou-se DTNB 0,01 M preparado em tampão fosfato-salino (PBS) 0,05 M (pH 8,0). A formação do ânion tiolato foi determinada a 412 nm e comparada com uma curva padrão de GSH. O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (1976).

Os níveis de ácido ascórbico (ASA) no fígado e cérebro foram determinados de acordo com Roe (1954). As amostras do fígado e cérebro foram homogeneizadas em Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) nas diluições 1:30 e 1:15 g/mL, respectivamente, e centrifugadas por 10 min a 2000 g. Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao TCA 5 % na proporção 1:1 (mL/mL) e centrifugada novamente a 3000 g por 10 min. Após esse procedimento, 0,3 mL foram adicionados à 0,1 mL de TCA 13,3 % e 0,075 mL de DNPH (preparado em ácido sulfúrico, tiureia e sulfato de cobre) e foram incubados a 37 °C por 3 horas. Após este período, foi adicionado ácido sulfúrico 65 % para parar a reação. Realizou-se a leitura em 520 nm e os valores foram comparados a uma curva padrão de ASA. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol ASA.g}^{-1}$ tecido.

2.7.3. Marcadores de estresse oxidativo

Para a determinação da peroxidação lipídica foi realizada a avaliação dos níveis de TBARS (produtos da reação com ácido tiobarbitúrico) segundo técnica descrita por Buege e Aust (1978) com algumas modificações. Realizou-se uma curva de calibração com MDA 0,03 mM, TCA 10 % e TBA 0,67 %. As amostras foram homogeneizadas em TFK 20 mM (pH 7,5) na diluição de 1:8 g/mL e centrifugada a 4000 g por 15 min e retirado o sobrenadante. Em uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas 0,5 mL de TCA e 1 mL de TBA. A mistura foi incubada por 30 min a 100 °C, esfriada, centrifugada por 10 min a 4000 g, após este procedimento a absorbância do sobrenadante foi determinada em 535 nm. A quantidade de peroxidação lipídica foi expressa em $\text{nmol MDA.mg proteína}^{-1}$.

A determinação de proteínas carboniladas foi realizada segundo Yan et al. (1995). O tecido foi homogeneizado em Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) na diluição 1:80 (fígado e rim) e 1:40 (cérebro) g/mL, onde a uma alíquota de 1 mL foi adicionado a 0,2 mL de DNPH 10 mM (preparado em HCl concentrado e água ultra pura) e a mistura foi incubada por 1 hora com agitação a cada 15 minutos. Após o período de incubação foi acrescentado 0,5 mL SDS 3 % preparado em tampão de fosfato de sódio monobásico 0,15 M e tampão fosfato de sódio dibásico 0,15 M (pH 6,7), 2 mL de álcool etílico e 2 mL de hexano, agitado e centrifugado por 15 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi retirado e os *pellets* foram lavados com álcool

etílico e acetato de etila 1:1 (mL/mL) e ressuspensionados e após dissolvidos em 1 mL de SDS. A absorbância foi determinada em 370 nm. Como branco foi utilizado 1 mL do homogeneizado e 0,2 mL de HCl 2 M, que foram submetidos ao mesmo procedimento das amostras. A quantidade de proteínas carboniladas foi expressa em nmol de carbonil.mg proteína⁻¹. O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (1976).

2.7.4. Análise dos marcadores de dano hepático e parâmetros metabólicos do plasma

As dosagens das atividades da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) presentes no plasma foram realizadas com kits comerciais (Labtest[®], Diagnóstico S. A., Minas Gerais, Brasil).

2.8. Análise estatística

Os dados foram representados por média \pm desvio padrão (DP) e analisados por Anova de uma via seguida pelo *post hoc* teste de Tukey. Em todos os casos foi estabelecido um nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de 5 % ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Fenóis totais, flavonoides totais e DPPH

Na determinação de fenóis totais e flavonoides totais, o EE apresentou maior concentração, se comparado ao EA (Tabela 1). O EE também teve maior porcentagem de potencial antioxidante (% PA), se comparado ao EA (Figura 1).

Tabela 1

Análises de fenóis totais, flavonoides totais e potencial antioxidante, dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne

Amostras	Fenóis totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)	DPPH CE ₅₀ (µg/mL)
EE	643,43	11,53	22,96
EA	187,21	8,58	91,13
Rutina	-----	-----	30,06

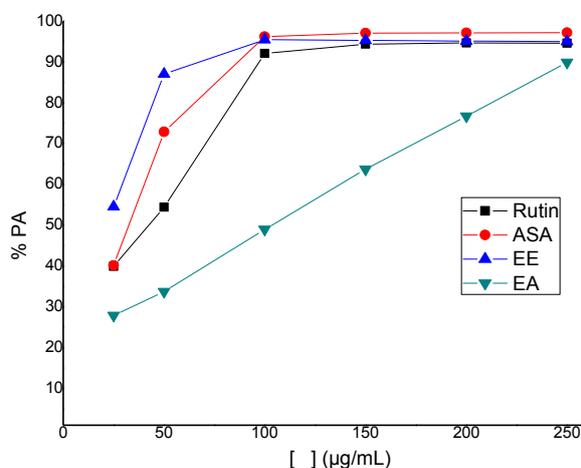


Fig. 1. Porcentagem de potencial antioxidante (% PA) dos padrões (rutina e ácido ascórbico) e dos extratos EE e EA da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne.

3.2. Análise de marcadores de dano e do estresse oxidativo no tecido hepático e plasma

Os camundongos expostos ao PCM, bem como aos grupos tratados com EE, EA ou rutina, não apresentaram alteração na atividade da SOD no fígado. Porém a CAT teve uma significativa diminuição (22,8 %; $P < 0,05$) no grupo exposto ao PCM se comparado com o grupo controle, e os extratos ou rutina, não alteraram os níveis de atividade da enzima. A GST, importante enzima na detoxificação de xenobióticos apresentou uma redução significativa (30,2 %; $P < 0,05$) de sua atividade no grupo PCM, se comparado ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2

Efeito dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, sob o estresse oxidativo induzido por PCM no tecido hepático.

Grupos	SOD (U.L ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)	CAT (µmol H ₂ O ₂ consumido.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)	GST (µmol GS-DNB.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)
Controle	6,89 ± 0,63	8,71 ± 1,19	1,26 ± 0,15
Rutina	6,77 ± 0,87	8,38 ± 1,27	0,97 ± 0,14
PCM	6,23 ± 0,60	6,72 ± 0,80*	0,88 ± 0,14*
PCM + Rutina	6,42 ± 1,10	8,15 ± 1,10	1,04 ± 0,25
PCM + EE	6,05 ± 0,43	7,41 ± 0,80	1,10 ± 0,19
PCM + EA	5,87 ± 0,68	7,69 ± 0,90	0,97 ± 0,20

EE	6,95 ± 1,13	7,90 ± 1,08	1,11 ± 0,22
EA	5,94 ± 1,25	7,90 ± 1,46	1,14 ± 0,17

Os resultados estão expressos como média ± D.P.; n= 8 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle. ANOVA de 1 via seguida por teste de Tukey.

Houve um aumento significativo da ALT de 25,8 % ($P < 0,0001$) no plasma do grupo PCM se comparado ao grupo controle, porém os grupos PCM + Rutina, PCM + EE e PCM + EA diminuíram significativamente (35%, 21,7% e 28,6% respectivamente; $P < 0,0001$) os níveis de ALT no plasma, se comparado com o grupo PCM (Figura 2). Já a atividade da AST foi afetada com um aumento de 64,5 % no grupo PCM e os animais tratados com rutina (PCM + Rutina) apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,0001$) de 55,9 % nos níveis plasmáticos desta enzima e os extratos não foram capazes de reverter esta alteração (Figura 3).

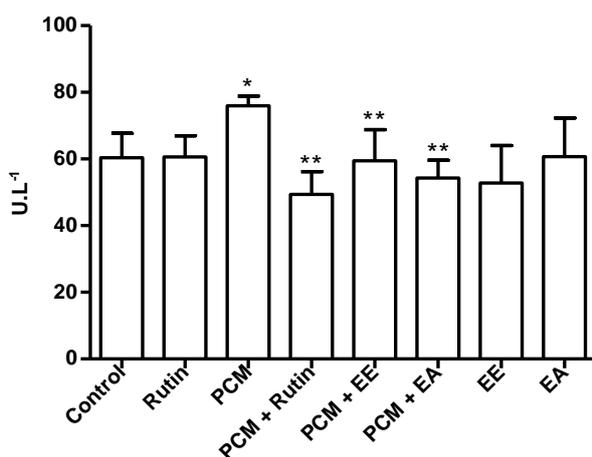


Fig. 2. Efeito dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, sob o estresse oxidativo induzido por PCM e os níveis da ALT no plasma dos camundongos após 7 dias de tratamento (n=7). * $P < 0,0001$ comparado com o grupo controle; ** $P < 0,0001$ comparado com o grupo PCM. ANOVA de 1 via seguida por teste de Tukey.

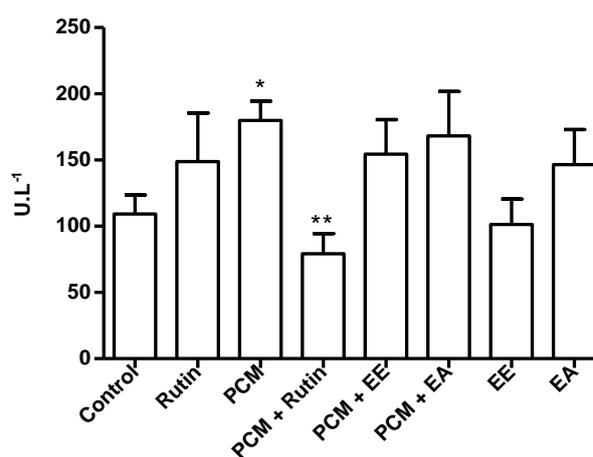


Fig. 2. Efeito dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, sob o estresse oxidativo induzido por PCM e os níveis da AST no plasma dos camundongos após 7 dias de tratamento (n=7). * $P < 0,0001$ comparado com o grupo controle; ** $P < 0,0001$ comparado com o grupo PCM. ANOVA de 1 via seguida por teste de Tukey.

A GSH, importante antioxidante não enzimático, diminuiu em 22,8 % no grupo PCM, se comparada ao grupo controle ($P < 0,0001$) e teve um aumento de 35 % no grupo tratado com PCM + EE se comparado com o grupo PCM ($P < 0,0001$) (Tabela 3).

O ácido ascórbico teve seu nível diminuído em 16,2 % no grupo PCM se comparado com o grupo controle. Entretanto, os animais tratados com PCM + EE ou PCM + EA

obtiveram um aumento significativo ($P < 0,0001$) de 18,2 % e 26,1 %, respectivamente quando comparados ao grupo PCM (Tabela 3).

Houve um aumento significativo ($P < 0,0001$) de 53,5 % na carbonilação de proteínas no grupo PCM, quando comparado ao controle. Porém, o PCM + EE diminuiu em 44,1 % o dano causado pelo PCM (Tabela 3).

A peroxidação lipídica (TBARS) não foi alterada nos animais expostos ao PCM e os tratamentos também não apresentaram efeito *per se* (Tabela 3).

Tabela 3

Efeito dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, sob o estresse oxidativo induzido por PCM no tecido hepático.

Grupos	GSH ($\mu\text{mol GSH.mg}$ proteína ⁻¹)	ÁCIDO ASCÓRBICO ($\mu\text{mol ASA.g}^{-1}$ tecido)	CARBONIL (nmol carbonil.mg proteína ⁻¹)	TBARS (nmol MDA.mg proteína ⁻¹)
Controle	164,50 ± 20,01	1,05 ± 0,10	1,70 ± 0,40	0,19 ± 0,03
Rutina	130,30 ± 23,49	1,05 ± 0,10	2,06 ± 0,49	0,14 ± 0,03
PCM	127,00 ± 22,31*	0,88 ± 0,10*	2,61 ± 0,49*	0,19 ± 0,02
PCM + Rutina	145,10 ± 13,38	0,92 ± 0,09	1,98 ± 0,37	0,20 ± 0,04
PCM + EE	171,40 ± 26,81**	1,04 ± 0,09**	1,46 ± 0,35**	0,17 ± 0,03
PCM + EA	144,20 ± 28,52	1,11 ± 0,11**	2,07 ± 0,36	0,23 ± 0,05
EE	134,50 ± 25,16	0,93 ± 0,06	2,31 ± 0,28	0,13 ± 0,02
EA	144,60 ± 8,37	1,15 ± 0,07	2,22 ± 0,50	0,19 ± 0,02

Os resultados estão expressos como média ± D.P.; n= 8 animais. * $P < 0,0001$ comparado com o grupo controle; ** $P < 0,0001$ comparado com o grupo PCM. ANOVA de 1 via seguida por teste de Tukey.

3.3. Análise de marcadores do estresse oxidativo no tecido renal

A atividade da CAT não foi alterada nos rins, no entanto o antioxidante não enzimático GSH teve uma diminuição significativa ($P < 0,0001$) de 43,3 % no grupo PCM quando comparado ao controle. O grupo controle positivo (PCM) apresentou maior nível de carbonilação de proteínas (71,3 %), contudo o grupo tratado com EA (PCM + EA) e rutina (PCM + Rutina) diminuíram de forma significativa ($P < 0,0001$) a carbonilação em 50,7 % e 30,4 %, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4

Efeito dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, sob o estresse oxidativo induzido por PCM no tecido renal.

Grupos	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido.min ⁻¹ . mg proteína ⁻¹)	GSH ($\mu\text{mol GSH.mg}$ proteína ⁻¹)	CARBONIL (nmol carbonil.mg proteína ⁻¹)
Controle	28,35 \pm 4,84	61,45 \pm 14,30	3,21 \pm 0,76
Rutina	25,22 \pm 3,81	45,76 \pm 14,83	4,35 \pm 0,63
PCM	25,67 \pm 3,02	34,86 \pm 9,77*	5,50 \pm 1,20 [#]
PCM + Rutina	23,45 \pm 3,57	48,52 \pm 9,48	3,83 \pm 0,78 ^{##}
PCM + EE	25,96 \pm 1,43	49,85 \pm 8,80	4,88 \pm 1,02
PCM + EA	26,22 \pm 2,85	52,61 \pm 13,50	2,71 \pm 0,62 ^{##}
EE	25,81 \pm 1,73	49,44 \pm 11,94	3,75 \pm 0,82
EA	26,44 \pm 2,45	45,42 \pm 6,22	4,31 \pm 0,63

Os resultados estão expressos como média \pm D.P.; n= 8 animais. * $P < 0,01$ comparado com o grupo controle; [#] $P < 0,0001$ comparado com o grupo controle; ^{##} $P < 0,0001$ comparado com o grupo PCM. ANOVA de 1 via seguida por teste de Tukey.

3.4. Análise de marcadores do estresse oxidativo no tecido cerebral

A atividade da CAT e os níveis de GSH não foram alterados no cérebro dos camundongos expostos ao PCM. Porém, o EE foi capaz de aumentar em 42 % o nível de ASA demonstrando um efeito *per se* (Tabela 5). O grupo controle positivo (PCM) aumentou em 28,5 % a carbonilação de proteínas, sobretudo os grupos tratados PCM + EE, PCM + EA e PCM + Rutina e EE reduziram de forma significativa ($P < 0,0001$) em 38,7 %, 35,7 %, 31,5 % e 42,3 % respectivamente, a carbonilação de proteínas no tecido cerebral (Tabela 5).

Tabela 5

Efeito dos extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne, sob o estresse oxidativo induzido por PCM no tecido cerebral.

Grupos	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido.min ⁻¹ . mg proteína ⁻¹)	GSH ($\mu\text{mol GSH.mg}$ proteína ⁻¹)	ÁCIDO ASCÓRBICO ($\mu\text{mol ASA.g}^{-1}$)	CARBONIL (nmol carbonil.mg proteína ⁻¹)
Controle	5,91 \pm 0,94	87,22 \pm 14,06	0,52 \pm 0,06	4,32 \pm 0,46
Rutina	5,53 \pm 0,78	93,88 \pm 16,55	0,62 \pm 0,06	4,05 \pm 0,56
PCM	6,29 \pm 0,85	88,54 \pm 16,78	0,54 \pm 0,08	5,55 \pm 0,80*
PCM + Rutina	5,95 \pm 1,10	86,30 \pm 10,56	0,70 \pm 0,10	3,81 \pm 0,63 ^{**}
PCM + EE	6,01 \pm 0,68	82,36 \pm 9,036	0,66 \pm 0,11	3,40 \pm 0,80 ^{**}

PCM + EA	6,27 ± 1,15	78,88 ± 10,76	0,64 ± 0,10	3,57 ± 0,63**
EE	6,51 ± 0,92	80,24 ± 10,26	0,74 ± 0,06*	3,20 ± 0,76*
EA	5,85 ± 1,12	94,83 ± 11,34	0,60 ± 0,04	4,30 ± 0,70

Os resultados estão expressos como média ± D.P.; n= 8 animais. * $P < 0,0001$ comparado com o grupo controle; ** $P < 0,0001$ comparado com o grupo PCM. ANOVA de 1 via seguida por teste de Tukey.

4. Discussão

O fígado é um órgão vital e de extrema importância para a manutenção metabólica e detoxificação endógena e exógena de xenobióticos e drogas. Se durante a exposição a essas substâncias os mecanismos de proteção natural do fígado não forem eficientes, pode resultar em dano hepático (Setty et al., 2007). De acordo com a Food and Drug Administration (2014) as drogas são as principais causadoras de dano hepático em pacientes, levando a insuficiência hepática e perda da função do órgão, o que pode ocasionar a morte.

O metabolismo de fármacos e outros produtos químicos podem nem sempre ser um evento bioquímico inócuo. Vários compostos são transformados metabolicamente em intermediários reativos (Correia, 2014), como por exemplo, o PCM. No entanto, o mecanismo de defesa antioxidante do organismo, que inclui enzimas como a SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx), além do sistema de defesa não enzimático tais como a glutathione, ácido ascórbico e α -tocoferol (Nijveldt et al., 2001), contribuem para a defesa do organismo.

O PCM é um fármaco que pode gerar toxicidade ao organismo em altas doses, ocasionando estresse oxidativo principalmente no tecido hepático, órgão alvo da metabolização do fármaco, onde é gerado o metabólito tóxico NAPQI. Este, para sua eliminação, requer a conjugação com a glutathione reduzida (GSH), e posterior excreção pela urina, na forma de ácido mercaptúrico, reduzindo desta forma a concentração de GSH. Com a depleção da GSH, há um aumento da formação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio nos hepatócitos (Hinson et al., 2010), causando um estresse oxidativo mitocondrial (Hodgman e Garrard, 2012), o que pode ser intensificado pelo acúmulo H_2O_2 , uma vez que a GPx requer como cofator a GSH, a qual está diminuída devido a overdose por PCM.

No estudo realizado por Mitchell et al. (1973), a administração de paracetamol em 225 mg/kg em camundongos não causou necrose hepática. No entanto, doses de 375 mg/kg geram necrose hepática em mais de 45 % dos animais examinados entre 6, 12 ou 48 horas. Em doses maiores (750 mg/kg) o paracetamol pode causar depleção de 70 % ou mais da GSH em 30 a 40 minutos.

Neste estudo a administração de 250 mg/kg de PCM nos camundongos foi capaz de promover uma diminuição da GSH em 22,8 % e o PCM + EE aumentou os níveis em 35 %. Isto pode ter ocorrido devido a uma provável ação protetora deste extrato pela presença de altas concentrações de fenóis totais (643,43 mg EAG/g).

O aumento na produção de espécies reativas do oxigênio durante o dano ao tecido resulta em consumo e esgotamento dos compostos de eliminação endógena (Nijveldt et al., 2001). Assim a depleção da GSH pode estar relacionada com a deficiência do sistema de defesa antioxidante, já que a GSH também atua como cofator da GST (Abdalla e Faine, 2008).

O metabólito tóxico NAPQI é inativado através da GST mediada pela conjugação com a GSH (Mohar et al., 2014). A GST, importante enzima na detoxificação de xenobióticos, apresentou uma redução da sua atividade no grupo exposto à intoxicação aguda por PCM, sugerindo que o PCM promova uma diminuição da atividade desta enzima, potencializando o dano, e nenhum dos tratamentos foram capazes de interferir na sua atividade.

Devido ao aumento das ERO e ERN o organismo pode sofrer alteração e adaptação em resposta à geração desses radicais, com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (Bianchi e Antunes, 1999), o que não foi evidenciado na pesquisa, onde o sistema de defesa antioxidante enzimático do tecido hepático não aumentou (CAT e GST), e sim, reduziu neste modelo experimental. E, tampouco, os tratamentos com os extratos ou a rotina, foram capazes de interferir nas atividades destas enzimas. Por outro lado, a SOD, enzima que atua sobre a conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não teve sua atividade alterada no grupo PCM. Porém, em um estudo realizado por Olaleye e Rocha (2008), usando este mesmo modelo experimental, a SOD apresentou uma redução da sua atividade.

A redução da atividade da CAT, importante enzima no processo de degradação do H_2O_2 , no fígado dos camundongos expostos ao PCM vai de acordo com outros estudos encontrados na literatura (Olaleye e Rocha, 2008; Shanmugam et al., 2013; Olaleye et al., 2014). Esta redução resulta em um aumento de peróxido de hidrogênio, que juntamente com o metabólico tóxico NAPQI, pode intensificar o dano hepático (Olaleye e Rocha, 2008), ocasionando um aumento da carbonilação de proteínas.

Na ausência da defesa antioxidante, a ligação às proteínas parece ser o evento mais crítico na iniciação da morte celular induzida por PCM. A overdose por PCM e o excesso de NAPQI formado leva ao esgotamento de GSH celular e, conseqüentemente, ligação covalente a proteínas celulares, que é o passo inicial de toxicidade (Jaeschke et al., 2011). Normalmente,

este metabólito reage com o grupo sulfidril da GSH e é excretado. No entanto, após consumir cerca de 70 % da GSH hepática, ele passa a reagir com as proteínas hepáticas, através de ligação covalente, gerando necrose hepática (Amaral et al., 2008), o que justifica o aumento da carbonilação de proteínas de 53,5 % observado neste estudo no grupo PCM. Porém, o EE por conter maior quantidade de compostos fenólicos foi capaz minimizar o dano a estas proteínas.

A ligação covalente do NAPQI às proteínas da membrana celular ocasiona a redução na atividade da Ca^{2+} -ATPase, resultando no aumento do nível de Ca^{2+} citosólico. O nível elevado do Ca^{2+} citosólico leva a disfunção na permeabilidade da membrana mitocondrial (MTP), devido ao aumento da captação de Ca^{2+} mitocondrial, resultando numa interferência na atividade da ATP-sintase, e conseqüentemente, diminuição na produção de ATP mitocondrial bem como o aumento do radical superóxido. Também pode ocorrer reação do radical superóxido com o óxido nítrico, formando o peroxinitrito e este, na ausência de GSH celular, causar extensiva oxidação e nitração de proteínas. Assim, essa combinação de eventos culmina em danos irreversíveis e necrose celular (Jaeschke et al., 2003). Além disso, o radical superóxido pode ser dismutado pela superóxido dismutase, formando o peróxido de hidrogênio (Barreiros et al., 2006), o que pode aumentar ainda mais a oxidação de proteínas e a lipoperoxidação.

O uso de produtos naturais, com propriedades antioxidantes, pode proteger eficazmente contra a toxicidade causada pelo metabólito tóxico do PCM (Jaeschke et al., 2011). O extrato etanólico da casca da *Copaifera multijuga* Hayne apresentou uma maior concentração de fenóis e flavonoides totais e um significativo potencial antioxidante se comparado com o extrato acetato de etila. Isto pode ser justificado pela presença de compostos fenólicos no extrato bruto, que foram extraídos em maior quantidade pelo álcool etílico.

Similarmente, outro solvente pertencente à mesma classe orgânica, o metanol, é utilizado pela sua alta capacidade em extrair compostos fenólicos. Em um estudo realizado com diferentes extratos da casca da *C. reticulata*, para prevenção de dano ao DNA, o extrato metanólico demonstrou bom potencial para o bloqueio de radicais livres, e isso se deve aos compostos presentes no extrato, que foram capazes de atuar como antioxidantes (Desmarchelier et al., 1997). De acordo com Bianchi e Antunes (1999), essa capacidade antioxidante está relacionada ao reparo dos danos nas moléculas de DNA e à reconstituição das membranas celulares danificadas.

Com o aumento da formação dos radicais livres, pode ocorrer uma peroxidação lipídica de membranas celulares. Este dano aos lipídios pode ser quantificado pelo TBARS e, nas análises realizadas neste estudo, os animais expostos ao estresse oxidativo induzido por PCM, não apresentaram aumento deste marcador de dano lipídico. Este resultado não era esperado, visto que pesquisas realizadas por Olaleye e Rocha (2008) e Rosa et al. (2012), indicam um aumento na formação de TBARS causada pela overdose por PCM.

Uma vez que muitos estudos sugerem que o PCM é hepatotóxico quando administrado em doses elevadas (Hinson et al., 2010; Hodgman et al., 2012; Kisaoglu et al., 2014), algumas enzimas hepáticas, são dosadas no intuito de poder confirmar este dano. Contudo, este dano foi confirmado pelo aumento na corrente sanguínea das enzimas ALT e AST, o que vai de acordo com Olaleye e Rocha (2008), em que o PCM nesta mesma dose (250 mg/kg) causou um aumento nos níveis plasmáticos destas aminotransferases. Nas dosagens de 600 mg/kg (Rosa et al, 2012), 800 mg/kg (Shanmugam et al., 2013), 1 g/kg (Kisaoglu et al., 2014), 2 g/kg (Olaleye et al., 2014) e 3 g/kg (Verma et al., 2013), também ocorre um aumento destas enzimas no plasma. Já os extratos EE e EA, bem como a rutina foram capazes de reverter o dano causado pelo PCM sobre a ALT, enzima encontrada no citoplasma dos hepatócitos, sugerindo que eles possam atuar como hepatoprotetores. Embora os extratos não tenham sido efetivos sobre a AST, importante enzima localizada na mitocôndria. Pode ser que os extratos não possuam uma atividade antioxidante tão pronunciada ao ponto de agir como protetor da membrana mitocondrial.

Além de estudar o perfil dos extratos com possível atividade antioxidante frente ao modelo de estresse oxidativo induzido por PCM, este estudo também quis ver se os extratos EE e EA apresentavam alguma propriedade hepatotóxica. No entanto, não foi evidenciada nenhuma alteração das aminotranferases quando comparadas ao grupo controle. Já em um estudo realizado com o óleo-resina da copaíba na dosagem de 0,63 mL/kg, apresentou redução nos níveis séricos da ALT e AST (Nuguchi et al., 2002). Isto sugere que tanto o óleo-resina (0,63 mL/kg), como os extratos da casca do caule (EE e EA 250 mg/kg), não apresentaram efeito hepatotóxico nos animais estudados.

Além do fígado, os rins também podem ser afetados pelo NAPQI, que pode atingir concentração suficiente para reagir com os constituintes celulares nucleofílicos (Nelson e Pearson, 1990), ocasionando necrose tubular proximal (McMurtry et al., 1978; Oshima-Franco e Franco, 2003). A glutatona desempenha um papel essencial na detoxificação do NAPQI no fígado e rim (Mitchell et al., 1973; Mudge et al., 1978). O aumento da carbonilação de proteínas no tecido renal no grupo PCM, pode ter ocorrido pela depleção da

GSH (43,3 %), já que a não conjugação do NAPQI pode resultar na ligação desta substância às moléculas nucleofílicas do tecido renal, ocasionando dano celular. Contudo, o tratamento dos animais com rutina ou EA apresentou uma diminuição nos níveis de carbonilação de proteínas, demonstrando um efeito protetor.

Tal como no tecido renal, a CAT não teve sua atividade alterada no tecido cerebral. A GSH também não foi alterada no tecido cerebral. No entanto, também houve um aumento da carbonilação de proteínas (28,5 %), porém foi bem menor se comparado aos demais tecidos (fígado 53,5 % e rins 71,3 %), onde o metabólito tóxico causou maior dano, possivelmente por atingir maiores concentrações. Os tratamentos PCM + EE, PCM + EA e PCM + Rutina foram capazes de reduzir este dano e, o EE apresentou um bom poder antioxidante já que ele possui uma maior concentração de fenóis totais.

Os antioxidantes não enzimáticos exógenos são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Dentre eles pode-se citar o ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, polifenóis e flavonoides. O ácido ascórbico é hidrossolúvel, exerce uma importante ação antioxidante nos fluidos extracelulares contribuindo para a regeneração do α -tocoferol a partir do radical tocoferoxil preservando a capacidade antioxidante deste nas membranas biológicas, bloqueando reações em cadeia e a peroxidação lipídica (Bianchi e Antunes, 1999; Augusto, 2006). Neste estudo, foi evidenciada uma diminuição de ASA do tecido hepático no grupo PCM e os extratos foram capazes de aumentar os níveis deste, sugerindo que a *Copaifera multijuga* Hayne possa estimular a síntese deste importante antioxidante não enzimático ou atuar como antioxidante nos camundongos, privando o consumo de ASA pelos tecidos submetidos ao estresse. Porém, no tecido cerebral, o PCM não causou alteração neste parâmetro e o extrato EE *per se* exerceu um importante papel aumentando os níveis de ASA, haja vista que é um tecido rico em lipídeos insaturados e susceptível ao dano oxidativo, e esse aumento nos níveis de ASA, pode contribuir para a proteção do tecido, contra radicais livres produzidos pelo próprio organismo.

Conclusão

A overdose por paracetamol causa dano hepático, sendo evidenciado pelo aumento de AST e ALT no plasma. O estresse oxidativo ocasionado pelo PCM é devido à depleção de GSH, redução da atividade da CAT e GST e redução de ASA. Estes eventos ocasionam um aumento da carbonilação de proteínas, afetando principalmente o tecido hepático. O tecido

renal também é afetado, observado pelo aumento da carbonilação de proteínas e isto ocorre devido à depleção de GSH. Já o tecido cerebral apresentou um dano demonstrado pelo aumento da carbonilação de proteínas. Os extratos (EE; EA 250 mg/kg) não foram capazes de interferir nas atividades das enzimas antioxidantes dos tecidos estudados. Porém, os extratos etanólico e acetato de etila da casca do caule da *Copaifera multijuga* Hayne demonstraram apresentar um efeito positivo sobre os antioxidantes não enzimáticos GSH e ASA, pois foram capazes de aumentar o nível no tecido hepático, bem como diminuir a carbonilação de proteínas no tecido hepático, renal e cerebral. O melhor efeito antioxidante *in vivo* e *in vitro* (DPPH), bem como nas análises de flavonoides totais e fenóis totais, deu-se ao extrato etanólico. Os estratos EE e EA também não apresentaram efeito hepatotóxico e nefrotóxico. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar parâmetros de toxicidade, atividade antioxidante e antiinflamatório.

Agradecimentos

Aos órgãos CAPES e FAPEMAT, pela concessão das bolsas a D. L. Pereira e A. P. S. Cunha, respectivamente.

À Ms. Ivani Kuntz Gonçalves da Universidade Federal de Viçosa e ao Dr. Haroldo Cavalcante de Lima do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela identificação botânica.

Referências

Abdalla, D.S.P., Faine, L.A., 2008. Radicais livres e antioxidantes. In: Oga, S., Camargo, M.M.A., Batistuzzo, J.A.O. (Org.). Fundamentos de toxicologia. 3ª ed. Atheneu: São Paulo, pp.38-58.

Augusto, O., 2006. Radicais livres, bons, maus e naturais. 1ª ed. Oficina de Texto: São Paulo, pp. 71-86.

Amaral, D.A., Hernandez, E.M., Barcia, S.A.D., 2008. Intoxicações por medicamentos. in: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Org.). Fundamentos de Toxicologia. 3ª ed. Atheneu: São Paulo, pp. 38-58.

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*, 29, 113-123. doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021

Bianchi, M.L.P., Antunes, L.M.G., 1999. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Revista Nutrição*, 12, 123-130. doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brasil. Ministério da Saúde., 2007. Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. Brasília, DF, 1, pp. 1-140.

Brasil. Fundação Vitória Amazônia., 2009. O uso de plantas medicinais no parque Nacional do Jaú. Available at: <<http://www.fva.org.br>>. Accessed november 30, 2014. Page Last Updated: 29 Jul 2009

Brasil. Sistema Nacional de informações tóxico farmacológicas - SINITOX., 2011. Available at: <http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386>. Accessed December 13, 2014. Page Last Updated: 10/22/2014

Brasileiro, B.G., Pizziolo, V.R., Matos, D.S., Germano, A.M., Jamal, C.M., 2008. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 629-636. doi.org/10.1590/S1516-93322008000400009

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-309.

Carbonari, K. A., 2005. Avaliação do Potencial Antioxidante (*in vitro* e *in vivo*) e Antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Carvalho, J.C.T., Cascon, V., Possebon, L.S., Morimoto, M.S.S., Cardoso, L.G.V., Kaplan, M.A.C., et al., 2005. Topical antiinflammatory and nalgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytotherapy Research*, 19, 946-950. doi.org/10.1002/ptr.1762

Correia, M.A., 2014. Biotransformação de fármacos. in: Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A. J. (Org.). *Farmacologia básica e clínica*. 12ª ed. Artmed: Porto Alegre, pp. 53-68.

Degáspari, C.H., Waszczynskyj, N., 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Revista Visão Acadêmica*, 5, 33-40.

Deus, R.J.A., Alves, C.N., Arruda, M.S.P., 2011. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, p.1-7.

FDA. Drug induced liver toxicity., 2014. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/ucm071471.htm>. Accessed December 13, 2014. Page Last Updated: 10/22/2014

Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P. Matheus, M.E., Fernandes, P.D., 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 486-492. doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.018

Gomes, N.M., Rezende, C.M, Fontes, S.P., Hovell, A.M.C., Landgraf, R.G., Matheus, M.E., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2008. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 179-184. doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.033

Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P., Matheus, M.E., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2010. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 177-183. doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.005

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249,7130-7139.

Hinson, J.A., Roberts, D.W., James, L.P., 2010. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 196, 369-405. doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_12

Hodgman, M.J., Garrard, A.R., 2012. A Review of Acetaminophen Poisoning. *Critical Care Clinics*. 28, 499-516. doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.006

Jaeschke, H., Knight, T. R., Bajt, M.L., 2003. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*, 144, 279-288.

Jaeschke, H., McGil, M. R., Williams, C.D., Ramachandran, A., 2011. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity. A clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sciences*, 88, 737-745. doi.org/10.1038/sj.mn.7800204

James, L.P., Mayeux, P.R. Hinson, J.A., 2003. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Journal Drug Metabolism and Disposition*. 31, 1499-1506. doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00239-X

Kisaoglu, A., Ozogul, B., Turan, M.I., Yilmaz, I., Demiryilmaz, I., Atamanalp, S.S., Bakan, E., Suleyman, H., 2014. Damage induced by paracetamol compared with N-acetylcysteine. *Journal of the Chinese Medical Association*, 77, 463-468. doi.org/10.1016/j.jcma.2014.01.011

Konn, H.I., Liversedge, M., 1944. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 292-300.

Lima, D.F., Pereira, D.L., Franciscon, F.F., Reis, C., Lima, V.S., Cavalcanti, P.P., 2014. Knowledge and use of medicinal plants for users of two basic health units. *Revista Rene*, 15, 383-90. doi.org/10.15253/2175-6783.2014000300002

Lima, S.R.M., Veiga-Jr, V.F., Christo, H.B., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*. 17, 1048-1053. doi.org/10.1002/ptr.1295

McMurtry, R.J., Snodgrass, W.R., Mitchell, J.R., 1987. Renal necrosis, glutathione depletion, and covalent binding after acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46, 87-100.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170-3175.

Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B., 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective Role of glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187, 211-217.

Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R., Brodie, B.B., 2003. Acetaminophen-Induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 187, 185-184.

Mohar, I., Stamper, B.D., Rademacher, P.M., White, C.C., Nelson, S.D., Kavanagh, T.J., 2014. Acetaminophen-induced liver damage in mice is associated with gender-specific adduction of peroxiredoxin-6. *Redox Biology*, 2, 377-387. doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.008

Mudge, G.H., Gemborys, M.W., Ruggin, G.G., 1978. Covalent binding of metabolites of acetaminophen to kidney protein and depletion of renal glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 206, 218-26.

Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy 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. doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4

- Nelson, S.D., Pearson, P.G., 1990. Covalent and non-covalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 30, 169-195. doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.001125
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*.74, 418-25.
- Noguchi, A., Reis, J.M.C., Dias, C.S., Epaminondas, W.A., Azevedo, P.S.R, Brito, M.V.H., 2002. Níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transpeptidase após a administração de óleo de copaíba em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.17, p. 130-134. doi.org/10.1590/S0102-86502002000200008
- Nogueira, E.O., Novaes, A. S.M., Sanchez, C.M.S., Andrade, C.M., Silva, M.F.A., 2012. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na proliferação celular *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 49, p. 293-300.
- 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*, 21, 486-492. doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.06.005
- Olaleye, M.T., Rocha, B.T.J., 2008. Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59, 319-327. doi.org/10.1016/j.etp.2007.10.003
- Oshima-Franco, Y., Franco, L.M., 2003. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde em Revista*, 5, 69-76.
- Paiva, L.A.F., Gurgel, L.A., Sousa, E.T., Silveira, E.R., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S.N., 2004. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 51-56. doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.028

Pieri, F.A., Silva, V.O., Souza, C.F., Costa, J.C.M., Santos, L.F., Moreira, M.A.S., 2012. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 64, p. 241-244.

Rio, R.G.W., 1996. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

Roe, J.H., 1954. Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic, and diketogulonic acids, In Methods of Biochemical Analysis, Glick, D., Ed., vol. 1, Interscience, New York, pp.115.

Rosa, E.J.F., Silva, M.H., Carvalho, N.R., Bridi, J.C., Rocha, J.B.T., Carbajo-Pescador, S., Mauriz, J.L., González-Gallego, J., Soares, F.A., 2012. Reduction of Acute Hepatic damage Induced by Acetaminophen after Treatment with Diphenyl Diselenide in Mice. Toxicologic Pathology, 40, 605-613. doi.org/10.1177/0192623311436179

Sedlack, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. Analytical Biochemistry, 25, 192-205.

Setty, S.R., Quereshi, A.A., Swamy, A.H.M.V., Patil, T., Prakash, T., Prabhu, K.; Gouda, A.V., 2007. Hepatoprotective activity of Calotropis procera flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. Fitoterapia, 78, 451-454. doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.022

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, 6, 342-345. doi.org/10.1016/j.jopr.2013.03.009

Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.

Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcanti, 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. doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021

Vasconcelos, K.R.F., Veiga Junior, V.F., Rocha, W.C., Bandeira, M.F.C.L., 2008. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 233-238. doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500017

Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., 2002. O genero *Copaifera* L. *Quím. Nova*. v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002. doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016

Veiga Junior, V.F., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.M.O., Pinto, A.C., 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne. A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 248-254. doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.005

Verma, P. K., Raina, R., Sultana, M., Prawez, S., Jamwal, N., 2013. Hepatoprotective mechanisms of *Ageratum conyzoides* L. on oxidative damage induced by acetaminophen in Wistar rats. *Free Radicals and Antioxidants*, 3, 73-76. doi.org/10.1016/j.fra.2013.05.009

Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Analytical Biochemistry*, 228, 349-351. doi.org/10.1006/abio.1995.1362

ANEXO A: 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 \times 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>.