

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALDA KAREN SANTOS PEREIRA MORAES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE *Dysphania ambrosioides*
L. E SEU EFEITO SOBRE INFLAMAÇÃO CRÔNICA**

São Luís

2018

ALDA KAREN SANTOS PEREIRA MORAES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE *Dysphania ambrosioides*

L. E SEU EFEITO SOBRE INFLAMAÇÃO CRÔNICA

Trabalho de Conclusão de Curso, em formato de artigo, apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

São Luís

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Moraes, Alda Karen Santos Pereira.
Caracterização Química da Fração Butanólica de
Dysphania ambrosioides L. e seu efeito sobre Inflamação
Crônica / Alda Karen Santos Pereira Moraes. - 2018.
28 f.

Orientador(a): Wanderson Silva Pereira.
Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do
Maranhão, 2018.

1. Dysphania ambrosioides. 2. Inflamação. 3.
Mastruz. I. Pereira, Wanderson Silva. II. Título.

ALDA KAREN SANTOS PEREIRA MORAES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE *Dysphania ambrosioides*
L. E SEU EFEITO SOBRE INFLAMAÇÃO CRÔNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso, em formato de artigo, apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Thiare Silva Fortes Braga

Universidade Federal do Maranhão

Msc. Letícia Prince Pereira Pontes

Universidade Estadual do Maranhão

Dedico a toda minha grande família, aos meus irmãos,
aos meus pais Aldo e Ivaldina e meu marido Luís Paulo,
por me inspirarem e me darem forças pra seguir meus
planos e concluir meus objetivos.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE *Dysphania ambrosioides* L. E SEU EFEITO SOBRE INFLAMAÇÃO CRÔNICA

CHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Dysphania ambrosioides* L. BUTANOLIC FRACTION AND ITS EFFECT ON CHRONIC INFLAMMATION

Alda Karen Santos Pereira Moraes [aldaksp2@gmail.com]

Departamento de Biologia

Universidade Federal do Maranhão

Av. dos Portugueses 1966 Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil

Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira [prof.mscwandersonpereira@yahoo.com.br]

Departamento de Biologia

Universidade Federal do Maranhão

Av. dos Portugueses 1966 Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil

Resumo

Dysphania ambrosioides L. (Amaranthaceae) possui atividades biológicas como imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatório, entre outros. A pesquisa avaliou o efeito da fração butanólica do Extrato Bruto Hidroalcolólico das folhas de *D. ambrosioides* sobre modelos de inflamação, que foram identificadas qualitativamente e testados sobre os mecanismos envolvidos com a resposta inflamatória em camundongos da linhagem swiss. Para obtenção da fração, as folhas de *D. ambrosioides* foram colhidas, secas e pulverizadas. A extração foi feita por maceração em etanol a partir do pó, fracionado por bipartição e obtida a fração butanólica, o qual foi submetido a avaliação fitoquímica qualitativa. Para avaliação do efeito no processo inflamatório crônico, animais foram anestesiados para indução de granuloma pela implantação de corpo estranho no dorso. Os animais foram tratados via oral diariamente (17 dias). No 18º dia, foram eutanasiados para avaliação do granuloma., após a retirada do mesmo e a obtenção do peso úmido e seco. O fêmur foi perfundido com 1 ml de PBS para obtenção da medula óssea e então a contagem do número total de células medulares. A pele proximal foi utilizada para descrição macroscópica e microscópica. Com os resultados obtidos através do tratamento com diferentes concentrações da fração butanólica observou-se que o grupo But0.5 não apresentou efeito anti-inflamatório, enquanto que a dose de 1.0mg/kg mostrou um efeito pro-inflamatório e a dose de 5.0mg/kg apresentou atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: Inflamação, *Dysphania ambrosioides*, mastruz.

Abstract

Dysphania ambrosioides L. (Amaranthaceae) has biological activities as immunomodulatory, antitumor, anti-inflammatory. The study evaluated the effect of the butanolic fraction of the EBH of the leaves of *D. ambrosioides* on chronic inflammation, which contains polar chemical compounds with anti-inflammatory potential, that were identified qualitatively and tested on the mechanisms involved with the inflammatory response in mice of the lineage swiss To obtain the fraction, the leaves of *D. ambrosioides* were harvested, dried and pulverized. The extraction was done by maceration in ethanol from the powder, fractionated by bipartition and obtained the butanolic fraction, which was submitted to qualitative phytochemical evaluation. In order to evaluate the effect on the chronic inflammatory process, animals were anesthetized for induction of granuloma by implantation of a foreign body on the back. The animals were treated orally daily (17 days). On the 18th day, they were euthanized to evaluate the granuloma, after removal of the granuloma and to obtain the wet and dry weight. The proximal skin was used for macroscopic and microscopic description. With the results obtained by the treatment with different concentrations of the butanolic fraction, it was observed that the group But0.5 did not present anti-inflammatory effect, whereas the dose of 1.0mg / kg showed a pro-inflammatory effect and the dose of 5.0mg / kg showed anti-inflammatory activity.

Key words: Inflammation, *Dysphania ambrosioides*, mastruz.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tabela de Prospecção Fitoquímica.....	17
Figura 2 – Imagem de formação de granuloma por corpo estranho.....	19
Figura 3 – Imagem de formação granulomatosa por corpo estranho e avaliação histológica do tecido proximal.....	21

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Modelo de Inflamação Edema de Pata.....	18
Gráfico 2 – Peso úmido do granuloma.....	19
Gráfico 3 –Peso seco do granuloma.....	19
Gráfico 4 – Células medulares.....	20

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
MATERIAIS E MÉTODOS	13
Material vegetal.....	13
Área e período de estudo	13
Preparo dos extratos	13
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	14
Prospecção Fitoquímica.....	14
Animais	14
Modelo de Edema de Pata	14
Indução de granuloma por corpo estranho.....	15
Obtenção e contagem de células da medula	15
Análise estatística.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	16
AGRADECIMENTOS	21
CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	21
REFERÊNCIAS	21
ANEXO	24

INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é um processo biológico no qual estão envolvidos componentes celulares e vasculares assim como muitas substâncias solúveis, sendo o primeiro passo para homeostasia no organismo em relação a um dano tecidual. Esse processo de homeostase envolve características como rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. O mesmo tem como finalidade a remoção do estímulo que induziu a resposta, dando início a recuperação do tecido local. No decorrer da inflamação de acordo com Cruvinel et al., (2010). Concomitantemente são liberadas substâncias solúveis, como citocinas, que realizam seu papel e logo em seguida são degradadas. Com o êxito no processo de inflamação, chega-se ao término da resposta aguda e reparo total do tecido (Cruvinel et al., 2010).

A resposta tecidual de inflamação apresenta 3 fatores principais que são: o suprimento de sangue para o local lesionado; maior permeabilidade capilar, devido à diminuição das células endoteliais que envolvem os vasos, permitindo que moléculas maiores saiam dos capilares e a migração de leucócitos das vênulas para os tecidos em estágio inicial da inflamação, os leucócitos aparecem somente nos estágios mais crônicos, também há migração para o local infectado ou lesionado por parte de monócitos e leucócitos (Male et al.,2014).

De acordo com Cruvinel et al., (2010), durante o processo de inflamação aguda, geralmente é predominante a presença de neutrófilos e macrófagos que são componentes da resposta imune inata. Enquanto que na inflamação crônica, geralmente causada por resistência do estímulo nóxico, a inflamação permanece e passa por modificações qualitativas determinadas por uma alteração gradativa nos componentes solúveis e celulares que penetram o tecido. Trata-se de uma continuação da resposta aguda, porém a inflamação crônica geralmente é assintomática, de caráter assindioso. A inflamação granulomatosa caracteriza-se pelo aglomerado de macrófagos gigantes, epitelioides, leucócitos mononucleares, principalmente linfócitos segundo Ruh et al., 2013.

Atualmente, de acordo com Schallembert e Pletsch (2013) as intervenções a processos crônicos de inflamação são feitos com uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), como a aspirina, diclofenaco, ibuprofeno entre outros, desde seus patentes tornaram-se as drogas de consumo de mais larga escala em todo o mundo, no entanto, há efeitos colaterais que só foram confirmados bem depois de todo esse consumo de AINE's. O fato é que a ação desses anti-inflamatórios, implica na inibição de ciclooxigenase-1 (COX-1), impedindo a reação inflamatória e a síntese de prostaglandinas. Assim como a ciclooxigenase-1, a ciclooxigenase-2 também se expressa durante o processo de inflamação, participando ativamente do mesmo, com a descoberta da síntese da COX-2 novos medicamentos foram desenvolvidos com o objetivo de conter menos efeitos colaterais (Schallembert & Pletsch ., 2013).

Contudo, uma outra vertente tem sido adotada, trata-se segundo Coutinho et al., (2009), da criação de novos medicamentos a partir de plantas, relataram que a separação de substâncias que ainda se utilizam nos dias de hoje, dos medicamentos reconhecidos e aprovados nos anos de 1981 a 2002, em torno de 60% destes, eram de origem vegetal. “As substâncias de origem vegetal, pertencentes as mais diversas classes químicas possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas destacam-se terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides”.

Na obtenção de um melhor proveito dos princípios ativos dos vegetais, é necessário a utilização adequada do que será utilizado da planta, deve-se saber qual princípio ativo que estes contêm e em que enfermidade será indicada. Para isso, existe preparo e uso da maneira correta a serem realizados. Os efeitos adversos são poucos no uso de fitoterápicos, contudo, sendo consumido na proporção adequada (Arnous et al., 2005).

Apesar do uso de plantas medicinais em tratamentos fazer parte de uma cultura milenar, deve-se certificar-se a respeito da toxicidade desses vegetais. Sabe-se que as drogas sintéticas, ou melhor, os medicamentos também possuem consequências como efeitos adversos e/ou colaterais, em virtude disto, procuram-se caminhos alternativos e/ou complementos medicinais, trabalhando principalmente com os efeitos terapêuticos de plantas medicinais que já são utilizadas pela população (Silva et al., 2015).

Dentre estes, *Dysphania ambrosioides* L. é uma espécie vegetal usada amplamente nos mais variados tipos de tratamentos, em toda a América Latina. Apesar de haver grande empirismo no que diz respeito a seus efeitos, muitas de suas atividades são comprovadas cientificamente. De acordo com Pereira et al., (2010), vale ressaltar que além de certos benefícios, *D. ambrosioides* também apresenta certa toxicidade quando utilizada em doses que ultrapassam de 10 a 100 vezes a dose terapêutica alterando células dos rins e do fígado.

D. ambrosioides pertence à família Amaranthaceae e tem sua origem nas Américas Central e do Sul, é amplamente conhecida como mastruz, erva-de-santa-Maria, lombrigueiro, quenopódio (Lorenzi e Matos, 2008). Suas folhas são utilizadas pela população, tanto na forma de infusões e chás, quanto na forma tópica através da maceração (Silva et al., 2015). Entre as atividades biológicas destacam-se efeitos larvicida (Morsy et al., 1998), antibacteriana (Lall e Meyer, 1999), moluscicida (Hmamouchi et al., 2000), fungicida (Delespaul et al., 2000), nematocida (Insunza et al., 2001), anti-helmíntico (Macdonald et al., 2004), cicatrizante (Pinheiro Neto et al., 2005), imunomoduladora (Cruz et al., 2007), antitumoral (Nascimento et al., 2006), leishmanicida (Bezerra et al., 2006; Patrício et al., 2008), anti-inflamatório (Trivellato et al., 2011), sobre o desenvolvimento de osteoartrite (Cadado et al., 2015) e anti-artrite (Pereira et al., 2018).

Esses efeitos podem estar relacionados a composição química que esse vegetal apresenta. Em média, possuem 60% de (Z)-ascaridol, 18% de (E)-ascaridol e 3% de carvacrol, além do α -terpineno, p-cimeno, piperitone, p-cimen-8-ol, acetato de (Z)-carvil, acetato de (E) piperitrol, álcool benzílico, α -terpineol, p-cresol e p-mentha-1,3,8-trieno, todos em menores concentrações presentes no óleo essencial desta planta (Oliveira et al., 2014). Além de constituintes como: ácidos orgânicos, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados, esteroides, triterpenoides, favonois e flavononas presentes nas folhas (Neiva et al., 2011). Com base nisso, é de interesse determinar a composição química qualitativa da fração butanólica do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *D. ambrosioides* e seu potencial efeito sobre a inflamação crônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *Dysphania ambrosioides* foram coletadas no Herbário Paz e Harmonia, no município de São José de Ribamar - Ma e identificadas no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, exsicata de nº 0998.

Área e período de estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunofisiologia (LIF), localizado no campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão. Para isso, foi submetido à análise e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, sob o protocolo de número 23115.005293/2015-14.

Preparo dos extratos

As folhas de *D. ambrosioides* foram secas a temperatura ambiente $\pm 37^\circ\text{C}$, trituradas para a obtenção do material (pó) que foi submetido à maceração a cada 8 h durante 24 h com álcool etílico (Merck, Brasil) a 70%. O processo de extração foi repetido por quatro vezes, sendo que a cada extração foi adicionado ao macerado a mesma quantidade de álcool etílico, tendo como produto o extrato bruto hidroalcoólico (EBH). O EBH seco foi fracionado em funil de separação com adição de 400 mL de metanol e hexano até a fase hexânica apresentar-se incolor, resultando na fração hexânica. A fase hidroalcoólica resultante do processo anterior foi, então, particionada com diclorometano de separação até que a fase diclorometano se apresentou incolor, dando origem à fração diclorometano. Em seguida, procedeu a partição da fase hidroalcoólica remanescente com acetato de etila em funil de separação, até que a fase acetato de etila se apresentasse incolor, resultando na fração acetato de etila. Por fim, a fase hidroalcoólica remanescente foi utilizada para a obtenção da fração butanólica

usando como solvente o butanol. Em seguida, a fração butanólica foi levada a um retroevaporador sob pressão reduzida, e finalmente liofilizado. Para o uso animal a fração foi sempre diluída em água apiogênica de acordo com a dose em estudo.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Prospecção Fitoquímica

Os testes fitoquímicos para detectar a presença dos compostos foram realizados seguindo a metodologia descrita por Matos (2009). Esses métodos se baseiam na observação visual de cor ou formação de precipitados e aparecimento de espuma após a adição de reagentes específicos. Foram realizados testes para as classes específicas de constituintes químicos, tais como fenóis, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, antocianinas, flavonas/xantonas e flavonoides, chalconas e auronas, flavonois, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, cumarinas, alcaloides, saponina, terpenos (triterpenoides), esteroides.

Animais

Para execução deste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, com 20-25g de peso corpóreo, adultos com aproximadamente 90 dias de idade, fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram alimentados com ração e água *Ad libitum* e tiveram ciclo claro-escuro padronizado de 12 – 12 horas.

Modelo de Edema de Pata

Antes da avaliação do efeito da fração butanólica sobre a inflamação crônica foi realizado experimento em modelo de inflamação aguda (edema de pata induzida por carragenina 1%). Para o tratamento, os animais receberam 1 hora depois da indução de carragenina 1% de 100µL por gavagem água apiogênica (grupo CONTROLE), indometacina 10 mg/kg (grupo INDO) ou frações em três doses diferentes (0.5, 1.0 ou 5.0mg/kg do peso do animal) diluídas em água apiogênica. Para a indução do edema de pata segundo Winter et al. (1962), que simula uma inflamação aguda com pico na 3ª hora, os camundongos receberam 50µL de carragenina a 1% no coxim plantar da pata traseira esquerda. O desenvolvimento do edema foi determinado com uso de pletismômetro (Ugo Basile) em tempos diferentes (0, 1, 2, 3 e 4 h) após a injeção de carragenina e tratamento único por via oral. Os dados foram expressos em porcentagens depois de calcular o índice de edema. O edema de pata foi avaliado em pletismômetro pela diferença de volume das patas no tempo zero (t0) e em diferentes

intervalos de tempo após a injeção de carragenina (tx). O índice de edema (IE) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$IE = \frac{(\text{volume da pata direita em tx} - \text{volume da pata direita em t0})}{\text{volume da pata direita em t0}} \times 100$$

Indução de granuloma por corpo estranho

Para indução do granuloma, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina 2% (Rompum®) (20 mg/kg), Cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol®) (25 mg/kg) e PBS, na proporção de 2:1:1 (v/v/v), via intramuscular (i.m.), para a indução de granuloma pela implantação de corpo estranho (algodão com peso de 0,001mg) no dorso, segundo Swingle e Shiderman (1972), com modificações. Os animais foram tratados logo após o efeito anestésico, por via oral, diariamente, durante 17 dias, com volume de 100 µL, de acordo com grupo pertencente (Controle, Dexametasona, But0.5, But1.0 e But5.0). O grupo Controle foi administrado com água apiogênica; grupo Dexametasona foi tratado com dexametasona (2mg/kg); os grupos But0.5, But1.0, But5.0 foram tratados com fração butanólica de *Dysphania ambrosioides* em seus respectivos grupos nas doses de 0.5mg/kg, 1.0mg/kg ou 5.0mg/kg, respectivamente. No dia 18, os animais foram eutanasiados por dosagem anestésica letal, posteriormente foram retiradas as patas traseiras esquerdas de cada animal, onde o fêmur foi perfundido com PBS para obtenção e contagem de células linfóides medulares. Para avaliação do granuloma, o mesmo foi retirado e pesado para obtenção do peso úmido. Após a obtenção do peso úmido, os implantes de algodão foram então colocados em estufa à 37°C durante 48 horas e pesados novamente para avaliar o peso seco. As peles próximas ao granuloma, foram removidas cirurgicamente para registro fotográfico, análise macroscópica e histopatológica. Os tecidos foram colocados em solução de formalina a 10%. A partir do peso final do granuloma (Úmido e seco) foi calculado o peso do granuloma utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de edema} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pi}} \times 100$$

Onde, Pf é o peso final da bola de algodão.

Pi é o peso inicial da bola de algodão.

Análise histopatológica

Os fragmentos de pele do dorso foram sujeitos a incorporação de parafina e à preparação de lâminas em seis etapas: fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão e coloração com hematoxilina-eosina para análise histopatológica de seções teciduais de forma descritiva.

Obtenção e contagem de células da medula

Ao final do tratamento as células da medula foram obtidas por perfusão do fêmur com 1 mL de PBS dos camundongos que sofreram indução de granuloma. 10 µL de solução de cristal violeta 0,05% em ácido acético 30% foi adicionado a 90 µL da suspensão celular. A quantificação celular foi feita em câmara de Neubauer (Sigma) com auxílio de microscópio óptico de luz.

Análise estatística

As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 ®. A comparação entre os grupos para análise de distribuição foi feita com o teste D'Agostin Pearson em seguida *Test t student* quando houver distribuição normal, ou pós-teste de Newman Keuls quando não houve distribuição anormal para avaliações no modelo de edema de pata, e os testes ANOVA one-way seguido de pós-teste de Mann –Whitney quando houver distribuição normal para modelo de granuloma. As diferenças foram consideradas significativas para valores de * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados epidemiológicos e experimentais tem mostrado que *Dysphania ambrosioides* apresenta potencial frente a diversas enfermidades, principalmente doenças de grande impacto na saúde pública, frente a inflamações crônicas e persistentes, podendo sobretudo agir direto ou indiretamente sobre células participantes das respostas imunológicas, agindo sobre mecanismos que são capazes de ativar ou inibir eventos envolvidos com a inflamação.

A avaliação fitoquímica, permite pesquisar os metabólitos secundários presentes no material analisado. Dependendo da presença ou ausência, e do teor, é possível avaliar se a amostra possui propriedades terapêuticas ou tóxicas, e ainda propriedades protetoras à formulação ou aos princípios ativos. Segundo Silva et al. (2015), utiliza-se tanto as folhas, como a parte radicular e inflorescências da planta, é relatado a presença no óleo essencial terpenos, de acordo com Jardim et al. (2008), o que lhe confere efeito anti-inflamatório e analgésico (Ibironke e Ajiboye, 2007). De acordo com Sá et al. (2014), dos dez compostos encontrados no óleo essencial das folhas de *D. ambrosioides*, observa-se α -terpineno, ρ -cymene, γ -terpineno, α -terpinenil-acetato, ascaridol, timol, carvacrol, isoascaridol, Óxido de limoneno e Phytol, em sua maioria são monoterpenos e monoterpenos oxigenados, sendo os principais α -terpineno (42,14%) e α -terpinenil-acetato (31,57%) além também de timol (7,90%).

Devido à escassez de dados referentes a constituição da fração butanólica de *D. ambrosioides*, ensaios foram realizados para avaliação qualitativa dos constituintes químicos do EBH e da fração butanólica das folhas e indicaram resultados negativos para fenóis, taninos hidrolisáveis, flavonoides (antocianinas e antocianidinas), flavononas, xantonas e flavonóis, chalconas e auronas,

leucoantocianidinas, catequinas, triterpenoides. Porém, apresentaram reação positiva para taninos condensados, flavononas, cumarinas, alcaloides e saponina. Levando em consideração a comparação entre o EBH e a fração butanólica, observou-se que apenas o EBH indicou a presença de flavonóis e esteroides (Tabela 1).

Tabela 1. Constituintes químicos do extrato hidroalcoólico e da fração butanólica do EBH de *Dysphania ambrosioides* L. obtidos por maceração.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	EBH	BUT
<i>Fenois</i>	-	-
<i>Taninos hidrolisáveis</i>	-	-
<i>Taninos condensados</i>	++	+
<i>Antocianinas e antocianidinas</i>	-	-
<i>Flavonas/xantonas e flavonoides</i>	-	-
<i>Chalconas e auronas</i>	-	-
<i>Flavonois</i>	++	-
<i>Leucoantocianidinas</i>	-	-
<i>Catequinas</i>	-	-
<i>Flavononas</i>	++	++
<i>Cumarinas</i>	+	++
<i>Alcaloides</i>	++	++
<i>Saponina</i>	++	+
<i>Terpenos (Triterpenoides)</i>	-	-
<i>Esteroides</i>	+++	-

Crerios adotados para expressar intensidade de resultados: +++ reação fortemente positiva; ++ reação moderadamente positiva; + reação fraca, - negativo. Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa de constituintes químicos realizado em triplicata no extrato bruto hidroalcoólico e sua fração butanólica, de *Dysphania ambrosioides* obtidos por maceração.

O fato do resultado da avaliação fitoquímica ter indicado a ausência de compostos que possuem atividade anti-inflamatória na fração butanólica, pode ser explicado devido ao processo da própria bipartição biomonitorada realizada com diferentes solventes. Acredita-se que a fração acetato de etila consiga carregar a totalidade desses metabólitos secundários, que muitas vezes são descritos pela sua ação anti-inflamatória. A complexação das saponinas com o colesterol, propriedade marcante atribuída as saponinas, deu origem a um vasto leque de trabalhos objetivando o uso de saponinas na dieta, com intuito de reduzir níveis de colesterol sérico (Simões, 2001).

Após relatos sobre o potencial anti-inflamatório com base nos constituintes químicos encontrados na fração butanólica das folhas de *D. ambrosioides*, foram realizados ensaios biológicos com o propósito de confirmar tal fato. Primeiramente foi utilizado modelo de edema de pata induzido por carragenina que é usado para avaliar os efeitos anti-inflamatórios de novos compostos. Esse procedimento apresenta duas fases principais. Sendo a primeira caracterizada pela liberação de histamina, leucotrieno, cinina e ciclooxigenase, após administração pela carragenina, e a segunda

fase, relacionada a produção de prostaglandinas, bradicinina e infiltração principalmente de neutrófilos (Vinegar et al., 1987).

Na presente investigação não foram observadas diferenças significativas entre grupos tratados com a fração em relação ao grupo controle, podendo estar relacionado a quantidade de administrações feitas, sugerindo que animais tratados em dias consecutivos pudessem apresentar resultados diferenciados, com isso, buscou-se um modelo de inflamação crônica.

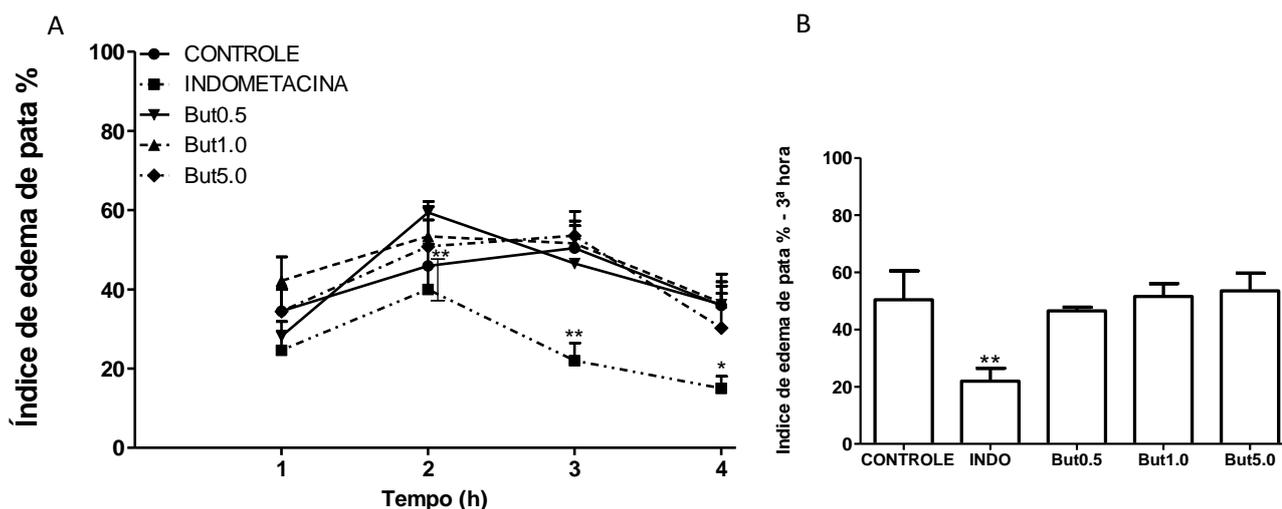


Figura 1. Efeito do tratamento com fração butanólica sobre indução de edema de pata por carragenina 1%. Camundongos Swiss fêmeas tratadas com 100 μ L por via oral com doses de 0,5, 1 ou 5 mg/kg da fração Butanólica, indometacina (10 mg/kg) ou água apiogênica (grupo controle) 1 h antes da indução do edema de pata. As patas foram administradas por injeção intra-plantar com 50 μ L carragenina a 1% na pata traseira esquerda. As patas foram mensuradas com pletismômetro nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a indução. (A) evolução do edema de pata. (B) índice da evolução do edema na 3ª hora após tratamento. Dados representam a média do índice de edema de pata \pm S.E.M. de três experimentos (n= 4/grupo). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ comparado com grupo controle por teste t de student.

De acordo com o modelo proposto, após a implantação do granuloma nos camundongos, com permanência de 17 dias corridos, pode-se observar instalação de atividade inflamatória, porém, em diferentes intensidades de um grupo para outro. Na figura 2 que mostra o peso úmido (edema e células) e seco (apenas células) dos granulomas, observou-se presença de atividade anti-inflamatória eficaz no grupo But5.0, quando comparado ao grupo Controle.

Plantas que demonstram propriedades anti-inflamatórias apresentam em sua composição fitoquímica altas concentrações em flavonoides assim como a *Achyrocline satureioides* (Macela) de acordo com Barata et al., (2009). Os flavonoides por exemplo, são os grupos mais presentes no metabolismo secundário de vegetais. Análises sobre a espécie de *Dysphania ambrosioides* mostram grande variedade também de saponinas e flavonoides, sugerindo que a presença desses compostos pode inibir a formação de mediadores no processo inflamatório independente da causa da inflamação. (Grassi et al., 2012). A cumarina tem capacidade de inibir a migração de neutrófilos para o local afetado, este efeito anti-inflamatório pode estar relacionado à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias no local inflamado. (Alves et al., 2012).

Observou-se também que os grupos But 0.5 e But 1.0, tratados com as respectivas doses de concentração da fração butanólica, quando comparados com o grupo controle, apresentam certa tendência a um efeito pró-edematogênico, onde não obteve-se resultado positivo em relação ao efeito anti-inflamatório, principalmente em relação ao grupo But 1.0, este além de não apresentar uma atividade esperada, ao contrário disto indica um efeito pró-inflamatório. No gráfico 1B apresentando o peso seco desses granulomas, após 48 horas a 37° C na estufa, obtendo-se o peso de células, foi observado que não houve diferença significativa entre o But 0.5 com o controle, que não recebeu tratamento. No entanto, no grupo But 1.0 ainda foi possível observar o indicativo de efeito pró-inflamatório.

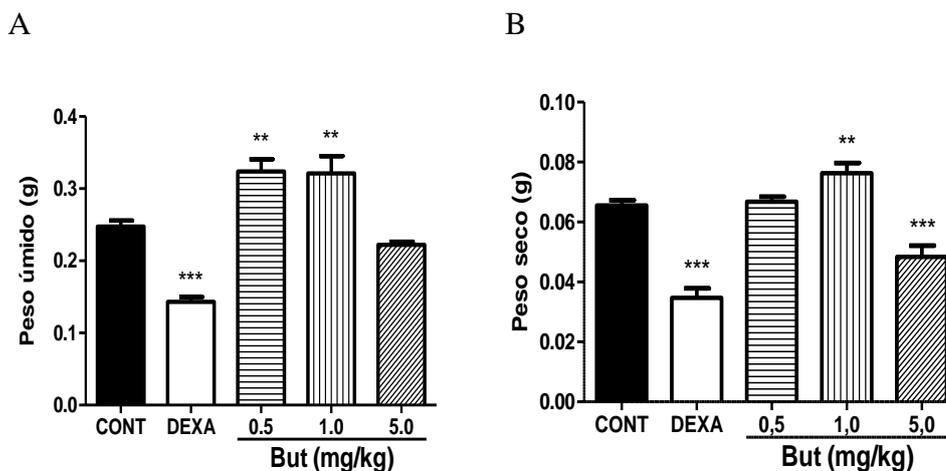


Figura 2- Efeito do tratamento com fração butanólica do EBH de *Dysphania ambrosioides* sobre a formação de granuloma por corpo estranho. Camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral nas doses de 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg, Dexametasona (DEXA) ou água de injeção (CONTROLE). (A) Peso úmido do granuloma. (B) Peso seco do granuloma. Os dados representam a média \pm S.E.M. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo CONTROLE, segundo teste ANOVA one-way.

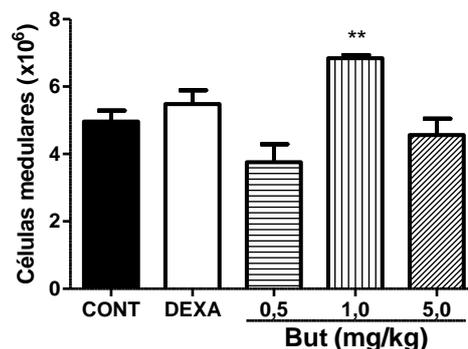


Figura 3- Efeito do tratamento com fração butanólica do EBH de *Dysphania ambrosioides* sobre a formação de granuloma por corpo estranho. Camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral nas doses de 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg, Dexametasona (DEXA) ou água de injeção (CONTROLE). Número de células medulares. Os dados representam a média \pm S.E.M. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo CONTROLE, segundo teste ANOVA one-way.

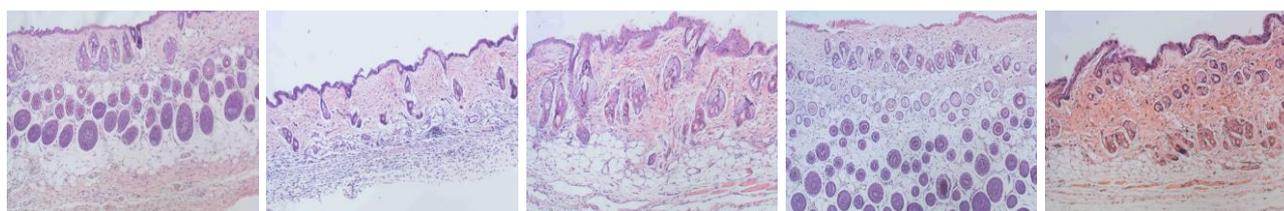
Em relação a contagem de células da medula óssea, com intuito de verificar o efeito da fração butanólica de *D. ambrosioides* sobre a produção de células no órgão primário do sistema imunológico, observou-se que apenas o grupo But1.0 apresentou aumento de células medulares, indicando que a fração nessa dose é capaz de ativar mecanismos que elevam a proliferação celular, o que poderia justificar de certa forma o aumento de células presentes no granuloma. Os dados apontam que na dose de 1.0mg/kg pode haver maior migração de células para o foco de inflamação, enquanto que a fração na dose de 5.0mg/kg poderia estar envolvido com mecanismos que bloqueiam o processo de diapedese, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no foco de produção celular, ou seja, na medula óssea, em relação ao grupo Controle (Figura 3).

Nas avaliações macroscópicas, percebeu-se que nos tecidos proximais dos granulomas dos animais pertencentes ao grupo But1.0 apresentavam-se com mais vermelhidão e vasodilatação, além de um tecido granulomatoso bem formado, muito parecido com o observado no grupo controle (Figura 4), o que sugere manutenção no fluxo normal de células para o foco inflamatório. O grupo But5.0 apresentou um granuloma menor quando comparado com o grupo Controle, sem vermelhidão aparente, assemelhando-se mais ao grupo Dexa em termos de características vasculares, ou seja, ausência de vasodilatações, o que demonstra visivelmente seu efeito anti-inflamatório.

Na avaliação histológica, percebe-se que o grupo Controle tem maior vascularização, ou seja, um aumento da irrigação local, quando comparados os grupos, é possível observar que mesmo todas as imagens tendo sido registradas com a mesma objetiva, o grupo controle apresentou maior espessura, possivelmente por estar mais inflamado, ou seja, mais edemaciado, assim como foi visto nos grupos But0.5 e But1.0, além disso, apresentam maior quantidade de neovascularização e de infiltração celular. Enquanto que o grupo But5.0 assim como o grupo DEXA, mostrando seu tecido menos espesso com menor vascularização e menor infiltração de células próximo do foco inflamatório (Figura 5). De acordo com Alves et al., (2009) a cumarina possui efeito antiinflamatório, sendo capaz de inibir a migração de neutrófilos e também a produção de citocinas para o local afetado. Assim como saponinas e flavonoides podem inibir a formação de mediadores na inflamação. (Trivelato-Grassi et al., 2009).



Figura 4- Imagem da formação de granuloma por corpo estranho. Tecido epitelial do dorso com formação granulomatosa após 17 dias do implante do algodão (10mg) nos camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral com água de injeção (CONTROLE), Dexametasona (DEXA), FBut nas doses de 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg (But0.5, But1.0 e But5.0, respectivamente).



CONTROLE

DEXA

But0.5

But1.0

But5.0

Figura 5 – Formação granulomatosa por corpo estranho e avaliação histológica do tecido proximal. Tecido epitelial do dorso com formação granulomatosa após 17 dias do implante de algodão (10mg) nos camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral com água estéril (CONTROLE), Dexametasona (DEXA), Fração Butanólica na dose de 0.5, 1.0 ou 5.0 mg/kg (But 0.5, But 1.0 e But 5.0, respectivamente).

De acordo com o trabalho realizado pode-se concluir que a fração butanólica do EBH das folhas de *Dysphania ambrosioides* L. na dose But 1.0 apresenta efeito proinflamatório enquanto que a dose But 5.0 apresenta efeito anti-inflamatório no tratamento de inflamação crônica em modelo de granuloma induzido por corpo estranho. Podendo estar envolvido com a presença de flavononas, cumarinas e alcaloide, preservando a arquitetura tecidual com pouca quantidade de neovascularização, vermelhidão, edema e infiltração celular. No entanto há a necessidade da contagem total de células de linfonodo inguinal e baço além também da dosagem de citocinas para a confirmação do efeito de migração de células para o foco inflamatório.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Wanderson Pereira pela orientação, paciência e acompanhamento, ao meus amigos e companheiros de laboratório de Imunofisiologia – LIF, Jaqueline Ribeiro, Lucas Sousa e Arthur Carvalho e ao Pibic – Foco Acadêmico pela bolsa concedida.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Jaqueline Ribeiro (Curso de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão), maceração de linfonodos, Lucas Sousa (Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão), sangria, e Arthur Carvalho (Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão), retirada do fêmur para obtenção da medula. Contribuindo com a execução do experimento.

REFERÊNCIAS

- Abolhassanzadeh, Z., Aflaki, E., Yousefi, G., Mohagheghzadeh, A. Randomized Clinical Trial of Peganum Oil for Knee Osteoarthritis. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, DOI: 10.1177/2156587214566867, 2014.
- Arden, N., Nevitt, Mc. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*; 20:3-25, 2006.
- Arnous, A. H., Santos, A. S., Beinner, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista espaço para a Saúde*, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- Alves, C. F. et al. Atividade antiinflamatória e possível mecanismo do extrato de *Mikania laevigata* na peritonite induzida por carragenina. *Jornal de Farmácia e Farmacologia*, v. 61, n. 8, p. 1097-1104, 2009.

- Barata, L. E. S., Alencar, A. A. J., Tascone, M., & Tamashiro, J. (2009). Plantas Medicinais Brasileiras. I. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.(Macela). *Revista Fitos Eletrônica*, 4(01), 120-125.
- Calado, G.P., Lopes A.J., Costa Junior, L.M., Lima, F.D., Silva, L.A., Pereira, W.S., Amaral, F.M., Garcia, J.B., Cartágenes, M Do. S., Nascimento, F.R.. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. *PLoS One*; 10(11): e0141886, 2015.
- Camanho, G. L. Tratamento de Osteoartrose de Joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia* v. 36, p. 135-140, 2001.
- Carvalho, W. A., Carvalho, R. D. S., Rios-Santos, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. 2004.
- Da Silva, D. L. F. et al. Potencial Anti-inflamatório das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. no modelo de Cistite Hemorrágica em camundongos. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 17, n. 1, p. 25-32, 2015.
- Cruvinel, W. D. M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. D., Silva, N. P. D., & Andrade, L. E. C. (2010). Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*.
- Fuller, R. Osteoartrose. In: LOPES, A.C. (Ed.). *Tratado de Clínica Médica*. São Paulo: Roca, v.1, Cap. 131, p.1721-1729, 2006.
- Goldring, M.B., Otero, M. inflamação na osteoartrite. *Current Opinion in Rheumatology*.; vol 23. (5) : 471-478, 2011.
- Grassi, L.T. et al. *Chenopodium ambrosioides* L. Erva de Santa Maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizante. 2011.
- Grassi, L. T. et al. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *Journal of ethnopharmacology*, v. 145, n. 1, p. 127-138, 2012.
- Hardingham, T. Extracellular matrix and pathogenic mechanisms in osteoarthritis. *Current Rheumatology*, vol 10, p.30–36, 2008.
- Ibironke, G. F., Ajiboye, K.I. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *Intern. J. Pharmac.* 3: 111-115, 2007Jardim, C.M., Jham, G.N., Dhingra, O.D., 2008. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*. 34, 1213-1218.
- Ibironke, G. F., Ajiboye K. I. Studies on the Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of *Chenopodium ambrosioides* Leaf Extract in Rats. *Int J Pharmacol* 2007; 3(1):111-115.
- Junior, V. F.V., Pinto, A. C., Maciel, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. *Química nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., & Roitt, I. M. (2014). *Imunologia*. Elsevier Brasil.
- Matos, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- Matos, F. J. A., & Lorenzi, H. (2008). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª edição. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 576.
- Matos, J. A. L. de. Potencial Biológico de *Chenopodium ambrosioides* L.(Erva-de-Santa-Maria). 2011. Tese de Doutorado. [sn].
- Nascimento, F. R. F., Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Azevedo, A.P.S., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. Life Sciences. 78, 2650-2653, 2006.
- Neiva, V. A. et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. Revista de Ciências da Saúde, v. 13, n. 2, 2011.
- Neto, E. S. S(+)-cetamina por via intra-articular em modelo experimental de osteoartrite em ratos. Nº 41. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Maranhão, 2012.
- Patrício, F. J., Costa, G. C., Pereira, P.V.S., Aragão-Filho, W.C., Souza, S.M., Frazão, J.B., Pereira, W.S., Maciel, M.C.G., Silva, L. A., Amaral, F.M.M., Rebêlo, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. Journal of Ethnopharmacology, v.115, p.313-319, 2008.
- Pereira, W. S. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. Journal of ethnopharmacology, v. 127, n. 3, p. 602-605, 2010.
- Pereira, W.S. Tese de Doutorado. Efeito do Extrato Bruto Hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre processos inflamatórios e o desenvolvimento da artrite experimental. Pós graduação em Biociências, Universidade do estado do Rio de Janeiro, 162 f., 2014.
- Rubim, E., Gorstein, F., Rubim, R., Schwarting, R., Strayer, D., Patologia. bases clinicopatológicas da Medicina. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- Ruh, A. C. et al. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 19, n. 1, p. 11-19, 2013.
- Sá, R. D., Galvão, M. A. M., Ferreira, M. R. A., Soares, L. A. L., & Randau, K. P. (2014). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. grown in Recife-PE, Brazil. *Rev. Bras. Farm*, 95, 855-866.
- Schalleberger, J. B., & Pletsch, M. U. (2014). Riscos do Uso Indiscriminado de Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (AINES). *Salão do Conhecimento*, 2(01).
- Silva, M. D. da. Estudos comportamentais e farmacológicos com a diacereína no modelo de monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund (cfa) em ratos. 2009. 76f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

Simões, C. M. O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P. de., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (org.)
Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS;
Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. p. 41-62

Sousa, C. D. M., Silva, H. R., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. D., Araújo, D. S., ... &
Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química
nova*, 30(2), 351-355.

Valério, E. da S. et al. Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólico de *Chenopodium
ambrosioides* L. e de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp. 2014.
Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará.

R. Vinegar, J. F. Truax, P. R. Selph, P. R. Johnston, A. L. Venable, and K. K. McKenzie, "Pathway
to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat," *Federation Proceedings*, vol. 46,
no. 1, pp. 118–126, 1987.

Yan, J.P., T, F.M., Wangw, W.Y., Cheng, Y., Xu, H.F., Song, H.P., Zhang, Y.Z., Zhang, L.. Age
Dependent Changes in Cartilage Matrix, Subchondral Bone Mass, and Estradiol Levels in Blood
Serum, in Naturally Occurring Osteoarthritis in Guinea Pigs. *International Journal of Molecular
Sciences*; 15, 13578-13595; doi:10.3390/ijms150813578, 2014.

ANEXO

ANEXO – NORMAS DA REVISTA FARMACOGNOSIA

A **Revista Brasileira de Farmacognosia** é um periódico destinado à publicação de trabalhos científicos originais, artigos de revisão e divulgação no campo da Farmacognosia (estudo dos produtos naturais biologicamente ativos).

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica da Farmacognosia, contendo uma visão crítica, com o objetivo principal de beneficiar clientela formada por pós-graduandos e não-especialistas da área. Os Editores da RBFAR poderão, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão. É desejável que o autor tenha publicações na referida área.

Artigos de Divulgação (em português, inglês ou espanhol): apresentação de algum aspecto ou área da Farmacognosia, redigido de forma didática, com o objetivo de beneficiar clientela formada por estudantes de graduação, pós-graduação, não-especialistas na área, farmacêuticos e professores de áreas afins.

1. NORMAS GERAIS

1.1 Todos os manuscritos submetidos devem ser inéditos. A publicação simultânea de manuscritos descrevendo o mesmo trabalho em diferentes periódicos não é aceitável. Os direitos de publicação passam a ser da Revista Brasileira Farmacognosia, inclusive traduções; publicações subseqüentes são aceitas desde que citada a fonte.

1.2 A **Revista Brasileira Farmacognosia** recebe para publicação trabalhos científicos originais, revisões e comunicações. O conteúdo dos trabalhos é de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.3 O idioma para a publicação é o inglês. Manuscritos escritos por autores cuja língua materna não é o inglês devem ser verificados por um serviço de edição profissional de língua inglesa antes da submissão. Auxílio de serviços de edição independente pode ser encontrado em <http://journalexperts.com?rcode=BJP>. Este trabalho é pago e de responsabilidade dos autores e o uso de um desses serviços de tradução não garante o aceite ou preferência para publicação.

1.4 A **Revista Brasileira de Farmacognosia** submeterá todos os manuscritos recebidos à análise de consultores ad hoc, cujos nomes permanecerão em sigilo e que emitirão pareceres para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, reapresentá-los ao(s) autor(es) com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista.

1.5 Toda idéia e conclusão apresentadas nos trabalhos publicados são de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.6 Todos os artigos envolvendo estudos com humanos ou animais deverão ter Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

1.7 Todo material vegetal utilizado na pesquisa descrita no trabalho deve ter a indicação do seu local de coleta (inclusive coordenadas obtidas por GPS, se possível), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e a localização da exsicata. Os autores devem estar preparados para fornecer evidência documental de que a aprovação para a coleta foi concedida pela autoridade apropriada no país de origem.

1.8 Os seguintes critérios de rejeição têm aplicação imediata: i) o manuscrito não se enquadra nas áreas da Revista; ii) o manuscrito é muito preliminar, com apenas relato de atividade biológica sem a comparação com uma referência ou sem um controle positivo; iii) a origem botânica não está claramente identificada, autenticada e documentada; iv) trabalhos experimentais de atividade antimicrobiana e antioxidante com extrato bruto sem a identificação das substâncias ativas isoladas e identificadas.

2. NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES

2.1 Os **autores** devem manter uma cópia eletrônica do manuscrito submetido, para o caso de possível perda ou danos causados ao original enviado à revista.

2.2 As **Figuras** (fotografias, gráficos, desenhos etc.) deverão ser apresentadas no final no texto, após as Referências, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas

deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas abaixo das figuras. Suas respectivas posições no texto deverão ser indicadas, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.3 As Tabelas e os Quadros também devem ser apresentados após as Referências, numerados consecutivamente em algarismos arábicos. As tabelas (dados numéricos) não podem ser fechadas por linhas laterais. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior dos mesmos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto, onde as tabelas e os quadros serão intercalados, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.4 As legendas de ilustrações botânicas devem ser de acordo com as normas adotadas pela revista. Solicitar as normas pelo endereço revista@sbfgnosia.org.br.

3. FORMATAÇÃO DO TEXTO E CONTEÚDO DO TRABALHO

3.1 *Original papers*. Trabalhos originais são artigos de pesquisa original descrevendo resultados experimentais. O manuscrito deve estar disposto na seguinte ordem: Título, Resumo, Unitermos, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Figuras com legendas, Tabelas, Fórmulas estruturais. Resultados e Discussão podem aparecer como duas partes distintas, ou como um combinado "Resultados e discussão". O tamanho normal do texto principal de um trabalho original, excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras, é de cerca de 3000 palavras. Em casos excepcionais e casos devidamente justificados, manuscritos podem ser aceitos. Ao submeter tais manuscritos, os autores devem apresentar uma justificativa com as razões para o texto ser longo.

3.2 *Short communication*. Esta seção é destinada principalmente para artigos que descrevem isolamento de substâncias conhecidas de nova fonte neotropical, ou resultados complementares de um trabalho em andamento. A comunicação deve ser escrita na seguinte ordem: Título, Resumo com 200 palavras, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos com detalhes dos dados experimentais sem sub-título, Resultados e Discussão em um corpo de texto sem título, Agradecimentos, no máximo vinte Referências, e no máximo três Figuras e/ou Tabelas. Os autores deverão limitar o texto a no máximo 2000 palavras.

3.3 Revisões geralmente a partir de convites pelo editor-chefe. Os textos devem ser concisos e não é necessário incluir detalhes experimentais. O principal objetivo de revisões é fornecer, de uma forma concisa e precisa, o estado-da-arte de um assunto e informar o leitor os desenvolvimentos mais recentes nesta área.

3.4 Além dessas normas, modelos para formatação de trabalhos originais e da carta de submissão estão disponíveis em www.sbfgnosia.org.br/revista. Os autores são convidados a utilizar esses modelos ao preparar um manuscrito.

3.5 Os originais deverão ser redigidos em folhas de papel tamanho A4, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2 cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, quinze e, no mínimo, cinco páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

3.6 Título e subtítulo: Deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito e objetivos da Revista. Estes deverão estar escritos em caixa baixa, negritados, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Para os trabalhos redigidos nas línguas Portuguesa e Espanhola, providenciar também versão do título para a língua Inglesa, o qual acompanhará o Abstract. O nome das plantas no título deve estar completo, incluindo nome do autor e Família, conforme <http://www.tropicos.org>.

3.7 Autores: Os nomes dos autores devem vir abaixo do título, centralizados. O nome e os sobrenomes devem aparecer na ordem correta, sendo obrigatório que o primeiro (nome) e o último (sobrenome) apareçam por extenso (e.g. Carlos N. U. Silva ou Carlos N. Ubiratan Silva). No caso de vários autores, seus nomes deverão ser separados por vírgulas.

3.8 Filiação dos autores: Após o nome de cada autor deverá constar um número Arábico, sobrescrito, que indica sua instituição de procedência e, deverá aparecer logo abaixo da nominata dos autores, também centralizado e com endereços completos, inclusive o CEP da cidade. Deve-se assinalar o nome do autor correspondente com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada. O endereço eletrônico institucional, telefone e fax do autor principal aparecerão na primeira página do trabalho como uma nota de rodapé. A revista não publica endereços eletrônicos comerciais.

3.9 Abstract: Deverá apresentar concisamente o trabalho destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho (máximo de 200 palavras). Os manuscritos devem vir acompanhados também da versão do resumo para a língua Portuguesa. Para autores não-brasileiros, o resumo em português será feito pela revista.

3.10 Keywords: Também em número máximo de seis e separados por vírgula.

3.11 Introdução: Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências a publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas e estejam disponíveis.

3.12 Material e Métodos: A descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho. Processos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

3.13 Resultados: Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes deverão ser submetidos a uma análise estatística.

3.14 Discussão: Deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Opcionalmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados em um único item.

3.15 Agradecimentos: Este item é opcional e deverá vir antes das Referências Bibliográficas.

4. REFERÊNCIAS

A formatação das referências deve ser padronizada em conformidade com as exigências da revista, como é mostrado abaixo:

4.1 Citações no texto: no início da citação: autor em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses. Ex. Pereira (1999); no final da citação: autor em caixa baixa e ano - ambos entre parênteses. Ex. (Silva, 1999) ou (Silva & Souza, 1998) ou (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b); citação textual: colocar, também, a página Ex. (Silva, 1999, p.24).

4.2 As Referências Bibliográficas serão ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação. Levar em consideração as seguintes ocorrências:

4.2.1 Revista: Será utilizado a abreviatura do periódico, em itálico, definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizado e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo. Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: (100-105).

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de *Chemical Abstracts*, como segue:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

Numa citação de citação, colocar o nome das fontes em itálico

Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.).

4.2.2 Livro:
Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Capítulo de livro:
Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman GT (org.). *A nova odontologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Tese e Dissertação:
Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congressos:
Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófi los humanos. *XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patentes:
Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do *Chemical Abstracts* deve ser informado.
Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Páginas Internet:
Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>, acesso em outubro 2009.

5. ABREVIATURAS

As unidades devem ser de acordo com o Sistema Internacional (SI) como adotado na 11th *General Conference on Weights and Measures*. Abreviaturas comuns para serem usadas são: m metro; ppm partes por milhão; cm centímetros; cpm contagem por minuto; mm milímetro; dpm desintegrações por minuto; μ m micrometro; nm nanometro; kg kilograma; g grama; mg miligrama; μ g micrograma; ng nanograma; LD50 dose letal média; mL mililitro; LC50 concentração letal média; μ L microlitro; Hz hertz; s segundos; M molar; min minutos; mM milimolar; h horas; M molar; μ M micro molar; SD desvio padrão; SE erro padrão; Ci Curie; X média. Ao usar uma palavra que é, ou está confirmada para ser, uma marca de propriedade comercial, os autores devem utilizar o símbolo ®.

6. ILUSTRAÇÕES

6.1 A qualidade das ilustrações depende da qualidade dos originais fornecidos. As Figuras não podem ser modificadas ou realçadas pela equipe de educação da revista. Os gráficos devem ser apresentados como parte do arquivo do manuscrito. O contraste é importante.

6.2 Remover as cores das ilustrações, exceto para os gráficos em que o autor gostaria de tê-los publicados coloridos (ver a seção de Custos abaixo para informações).

6.3 Coloque as figuras em formato .TIFF, .jpg ou .eps, indicando o número e o título da figura. Tons não são aceitáveis. IncriçõesAs legendas devem estar com fonte Times New Roman, em um tamanho razoável que possa estar legível após redução, quando necessário.

7. CUSTOS

A Revista custeará integralmente os trabalhos de até quinze páginas, incluindo tabelas e figuras. Acima deste número de páginas, as despesas correrão por conta do(s) autor(es). Não serão aceitas fotografias coloridas, a não ser que o(s) autor(es) custeiem sua publicação, independente do número de páginas do trabalho.

8. PROVAS TIPOGRÁFICAS

As provas tipográficas serão enviadas ao autor correspondente em arquivo PDF. Modificações de frases ou adições não são permitidas nesta fase. É da responsabilidade do autor correspondente garantir que todos os autores do manuscrito estejam de acordo com as alterações feitas sobre as provas. As provas tipográficas devem retornar no prazo de cinco dias, a contar da data do recebimento das mesmas a fim de garantir a publicação do manuscrito no prazo.

Todo contato com a revista deve ser feito ao Editor, conforme endereço abaixo:

Revista Brasileira de Farmacognosia
Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor
Laboratório de Farmacognosia
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br

