

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
LUCIANA CUTRIM DIAS

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Dysphania  
ambrosioides* L. E SEU EFEITO SOBRE MODELOS DE INFLAMAÇÃO.**

São Luís  
2018

LUCIANA CUTRIM DIAS

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Dysphania ambrosioides* L. E SEU EFEITO SOBRE MODELOS DE INFLAMAÇÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Maranhão como exigência parcial para obtenção do título de Graduada em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

São Luís

2018

LUCIANA CUTRIM DIAS

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Dysphania ambrosioides* L. E SEU EFEITO SOBRE REAÇÃO GRANULOMATOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Maranhão como exigência parcial para obtenção do título de Graduada em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_

BANCA EXAMINADORA:

**Dr Wanderson Silva Pereira (Orientador)**

---

Profa.

**MS. Thaiare Silva Fortes Braga**

---

Profa.

**Msc. Luís Douglas Miranda Silva**

---

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

CUTRIM DIAS, LUCIANA.

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE  
Dysphania ambrosioides L. E SEU EFEITO SOBRE REAÇÃO  
GRANULOMATOSA / LUCIANA CUTRIM DIAS. - 2018.

46 f.

Orientador(a): Dr. Wanderson Silva Pereira.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2018.

1. Efeito anti-inflamatório. 2. Granuloma. 3.  
Mastruz. I. Silva Pereira, Dr. Wanderson. II. Título.



A minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, pela presença constante e por oportunizar este percurso em minha trajetória terrena, a ele seja dada todos os méritos. A minha família pela paciência em tolerar a ausência, em especial aos meus pais, Ana Rosa Cutrim Dias e Raimundo Nonato Rodrigues Dias e por minha tia, Maria das Neves Sousa Cutrim, pelo incentivo, dedicação e esperança, divido com vocês esta conquista porque ela também vos pertence. A meus irmãos Michelle, Leila, Carlos e Lucíleia, as minhas tias Verônica e Ana Lucia, minha prima Alana e sobrinhas Bruna, Brena, Vivian, Alicia e Rebeca, cunhado Alisson e aos demais familiares dedico a vocês todo carinho e incentivo moral, obrigada!

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho e, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Wanderson Pereira, por toda a orientação dada.

Aos professores e colegas do Laboratório de Imunofisiologia, pelas orientações e solicitude.

*“O temor do Senhor é o princípio do saber mas os  
loucos desprezam a sabedoria e o ensino. ”*

***Provérbio de Salomão cap. 1:7***

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do tratamento com FAcOEt do EBH de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. sobre indução de edema de pata .....	20
Figura 2. Efeito do tratamento com FAcOEt do EBH de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. sobre a formação de granuloma por corpo estranho.....	22
Figura 3. Efeito do tratamento com FAcOET do EBH de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. sobre o peso dos órgãos linfoides de animais com formação do granuloma.....	23
Figura 4. Efeito do tratamento com FAcOET do EBH de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. sobre o número de células dos órgãos linfoides de animais com formação do granuloma.....	24
Figura 5. Efeito do tratamento com fração acetato de etila das folhas de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. sobre perfil das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ .....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Avaliação qualitativa dos constituintes químicos do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila do EBH de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:4.....	19
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA – Citometria de fluxo

EBH - extrato bruto hidroalcoólico

FACoET- frações acetato de etila.

PAF - fator ativador de plaquetas

PBS - tampão fosfato de potássio

EROS - Oxigen-reactive species

UERJ – Universidade Federal do Maranhão

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Área e período de estudo	14
2.2 Preparo do extrato bruto hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	15
2.3 Método de análise fitoquímica	15
2.4 Delineamento experimental em modelo animal	15
2.4.1 Animais	15
2.4.2 O modelo de edema de pata	16
2.4.3 Indução de granuloma por corpo estranho	16
2.5 Obtenção e contagem de células linfoides	16
2.5.1 Células do baço	16
2.5.2 Células da medula óssea	17
2.5.3 Células dos linfonodos	17
2.6 Coleta de Sangue e análise de Citometria de fluxo	17
2.7 Análise estatística	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
3.1 Análise Fitoquímica: avaliação qualitativa	18
3.2 Avaliação biológica	19
3.2.1 Edema de pata	19
3.2.2 Granuloma	21
3.2.3 Peso da Células dos Órgãos Linfoides	22
3.2.4 Número de Células dos Órgãos Linfoides	23
3.2.5 Citocinas	24
4 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

# AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Dysphania ambrosioides* L. E SEU EFEITO SOBRE REAÇÃO GRANULOMATOSA

Luciana C. Dias<sup>a</sup>, Flávia R. F. Nascimento<sup>a</sup>, Marsen G. P. Coelho<sup>b</sup>, Wanderson S. Pereira<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Bioquímica, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**RESUMO:** *Dysphania ambrosioides* L. (Amaranthaceae), conhecido popularmente como mastruz, apresenta ação antitumoral, imunoestimulatória e anti-inflamatória, e esse efeito possivelmente está envolvido com a composição química, sendo relatado na literatura a presença principalmente de flavonoides e terpenos. Diante disso, buscou-se determinar a composição fitoquímica qualitativa da fração acetato de etila das folhas de *Dysphania ambrosioides* e seu efeito sobre modelo de inflamação. As folhas foram secas a  $\pm 37^\circ \text{C}$  e moídas, maceradas com álcool etílico 70%. Em seguida, foi realizado fracionamento por bipartição com solventes de diferentes polaridades, obtendo-se a fração acetato de etila (FACoET). A análise da composição fitoquímica foi feita de maneira qualitativa. Para avaliação do efeito sobre a inflamação adotou-se modelos de edema de pata pela injeção de 50  $\mu\text{L}$  de carragenina a 1% para determinação de doses ativas e formação de granuloma por corpo estranho (algodão), que foram induzidos em camundongos machos Swiss. Os tratamentos foram únicos ou diários, de acordo com o modelo, com 100  $\mu\text{L}$  da fração por via oral. Na análise fitoquímica observou-se a presença de taninos condensados, flavonona, cumarinas, alcaloides, saponinas e esteroides. Os resultados obtidos através dos modelos de edema pata e granuloma mostraram que a dose de 5mg/kg de FACoET apresenta efeito anti-inflamatório com tratamento único ou diário, intervindo nos processos edematogênicos na fase aguda e na migração de macrófagos para a formação granulomatosa, provavelmente mediados pelo bloqueio de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e IFN- $\gamma$ .

**Descritores:** Efeito anti-inflamatório, granuloma, mastruz.

**ABSTRACT:** “Phytochemical evaluation of fraction of etila acetata of *Dysphania ambrosioides* L. and its effect on granulomatosa reaction”. *Dysphania ambrosioides* L. (Amaranthaceae), popularly known as mastruz, has antitumor, immunostimulatory and anti-inflammatory action, and this effect is possibly involved with chemical composition, being reported in the literature the

---

\* Autor para correspondência.

E-mail: prof.mscwandersonpereira@yahoo.com.br

presence mainly of flavonoids and terpenes. The aim of this study was to determine the qualitative phytochemical composition of the ethyl acetate fraction of leaves of *Dysphania ambrosioides* and its effect on the formation of granuloma. The leaves were dried at + 37 ° C and ground, macerated with 70% ethyl alcohol. Then, fraction alisation was carried out by bipartition with solvents of different polarities, obtaining the ethyl acetate fraction (FAcOET). The analysis of the phytochemical composition was done in a qualitative way. To evaluate the effect on chronic inflammation paw edema models were injected with 50 µL of 1% carrageenan for the determination of active doses and formation of granuloma by foreign body (cotton), which were induced in Swiss male mice. Treatments were either single or daily with 100 µL of oral fraction. In the phytochemical analysis the presence of condensed tannins, flavonone, coumarins, alkaloids, saponins and steroids were observed. The results obtained through the paw and granola edema models showed that the dose of 5mg / kg of FAcOET has an anti-inflammatory effect with single or daily treatment, intervening in the edematogenic processes in the acute phase and in the migration of macrophages to the granulomatous formation, probably mediated by the blockade of proinflammatory cytokines such as IL6 and IFN- $\gamma$ .

**Descriptors:** Anti-inflammatory effect, granuloma, mastruz.

## 1 INTRODUÇÃO

*Chenopodium ambrosioides* L. ou de acordo com o Trópico (GARDEN, 2017), *Dysphania ambrosioides* L. (nome atualmente mais aceito) (Amaranthaceae) tem sua origem nas Américas Central e do Sul, sendo considerada atualmente uma espécie cosmopolita, silvestre ou cultivada; pode crescer até um metro de altura e possui forte odor aromático. A espécie tem como nomes vernaculares: mastruz, erva-de-santa-Maria, lombrigueiro, quenopódio (LORENZI et al., 2008).

Apesar de haver grande empirismo no que diz respeito aos efeitos de *D. ambrosioides*, muitas de suas atividades são comprovadas cientificamente, como as ações antifúngica (JARDIM et al., 2008), leishmanicida (PATRÍCIO et al., 2008), anti-inflamatória em modelos agudos e crônicos de inflamação (TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013), podendo tratar cistite hemorrágica (SILVA et al., 2015), possuindo ainda atividade analgésica (SOUSA et al., 2012), interagindo inclusive com o DNA, podendo ser o principal responsável também por seu efeito citotóxico (GADANO et al., 2006).

Pesquisas têm demonstrado que *D. ambrosioides* apresenta ação imunomoduladora, interferindo no desenvolvimento de algumas enfermidades e comprovando os efeitos farmacológicos em humanos que levam a ser utilizada pela população, estudos utilizando o extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *D. ambrosioides* e sua fração acetato de etila (FACoEt) se mostraram eficazes em reduzir a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*, sendo que o primeiro também foi capaz de inibir de forma profilática a infecção (LIMA JUNIOR et al., 2014). Nascimento et al. (2006), avaliaram o efeito do EBH sobre o desenvolvimento tumoral utilizando o modelo de tumor de Ehrlich nas formas sólida e ascítica *in vivo* e demonstraram que esse extrato apresenta potencial efeito antitumoral, tanto profilático como terapêutico. Esse efeito pode estar diretamente ligado à atividade que o EBH desempenha sobre a ativação de células imunológicas como macrófagos, assim como o recrutamento e/ou proliferação de células nos órgãos linfoides secundários como baço e linfonodos (CRUZ et al., 2007).

Além disso, há informações na literatura sobre o efeito do EBH sobre modelos de inflamação, o modelo de edema de pata que simula uma inflamação aguda é caracterizada por apresentar uma resposta imediata de curta duração, suas principais características são: alterações no calibre vascular levando a um aumento do fluxo sanguíneo local; mudanças estruturais na microvasculatura que permitem a saída de proteínas plasmáticas e de leucócitos, formando edema e migração de leucócitos da microcirculação (CHERTOV et al., 2000).

Uma vez persistente, há instalação de inflamação crônica, que é caracterizada por mecanismos que incluem passagem dos leucócitos do compartimento vascular para o tecido extravascular guiada por interações adesivas específicas entre os leucócitos e as células endoteliais,

eventos envolvidos com recrutamento leucocitário, como marginação e captura dos leucócitos livres, para a simulação desses eventos, a formação de granuloma é proposta, pois trata-se de um processo onde há implantação de corpo estranho (algodão) com duração de 6 dias permitindo assim, análise de fatores das várias fases da inflamação, desde a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular até a participação celular (SWINGLE; SHIDMAN, 1972).

Em se tratando de uma doença de caráter crônico, estudos têm sido realizados com o intuito de amenizar os efeitos colaterais que os medicamentos convencionais, uma das estratégias seria a busca por tratamentos alternativos, como o uso de produtos naturais que apresentam custo mais baixo e menos efeitos colaterais. Com base nisso, entre as pesquisas científicas já desenvolvidas têm-se observado grande potencial de *D. ambrosioides* no tratamento desse tipo de doença, como no estudo de Pereira et al. (2018), que demonstraram o efeito antiartrítico em modelo de artrite experimental induzida com por colágeno tipo II.

A ação anti-inflamatória dessa espécie vegetal pode ter relação com sua composição química: diferentes terpenos, esteróides, saponinas e flavonóides (KOKANOVA-NEDIALKOVA et al., 2009; NEIVA et al., 2011. BARROS et al. (2013) mostraram alta quantidade de flavonóides, como derivados de quercetina e kaempferol, atribuindo-lhes o efeito antioxidante de *D. ambrosioides*. Uma vez que existem muitas evidências da relação entre a eliminação de radicais livres e as atividades anti-inflamatórias, pode-se concluir que os antioxidantes desempenham um papel benéfico no tratamento de doenças inflamatórias (CONNER; GRISHAM, 1996).

Assim como o EBH, a fração acetato de etila possui constituintes polares, os quais podem estar diretamente ligados às atividades terapêuticas já citadas. No entanto, são escassos os dados referentes às composições fitoquímicas da FAcOEt das folhas de *D. ambrosioides*. Desse modo, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a composição fitoquímica da fração acetato de etila do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* através do método de análise fitoquímica - proposto por Matos (1997) - e seu efeito anti-inflamatório sobre o modelo de granuloma em camundongos.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 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.

## **2.2 Preparo do extrato bruto hidroalcoólico de *D. ambrosioides***

As folhas de *D. ambrosioides* L. será 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, Brasil. As folhas foram secadas 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 PA (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 fracionamento foi realizado pela partição sequencial com solventes de polaridade crescente (metanol e hexano, diclorometano, acetato de etila e butanal) a partir do EBH seco, sendo que neste trabalho foi utilizada somente acetato de etila. O EBH seco foi biofracionado em funil de separação com adição de 400 mL de acetato de etila em funil de separação, até que a fase acetato de etila se apresentasse incolor, resultando na fração acetato de etila e uma fase hidroalcoólica remanescente. Posteriormente, a fração acetato de etila foi concentrada em evaporador rotativo. A fração foi armazenada em recipiente de vidro estéril a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. As demais frações foram armazenadas para outros fins (ANDRADE et al., 2005).

## **2.3 Método de análise fitoquímica**

A determinação dos principais metabólitos secundários foi realizada de acordo com metodologia qualitativa proposta por MATOS (1997). 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, flavonóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, cumarinas, alcaloides, saponina, terpenos (triterpenoides), esteroides.

## **2.4 Delineamento experimental em modelo animal**

### **2.4.1 Animais**

Para execução deste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* adultos com aproximadamente 3 meses, peso médio de 32,75g, machos, 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.

#### 2.4.2 O modelo de edema de pata

Para a determinação de doses efetivas foi utilizado o modelo de edema de pata, segundo Winter et al. (1963), onde os animais foram divididos em 5 grupos de 5 animais, os mesmos receberam 50 uL de carragenina a 1% na pata traseira esquerda do camundongo 1 h depois do tratamento oral com 100 uL da fração em diferentes doses (0,5, 1 ou 5 mg / kg) ou de indometacina (10 mg / kg). O grupo controle recebeu 100 mL de água destilada. O edema foi determinado com uso de pletismómetro (Ugo Basile) em tempos diferentes (0, 1, 2, 3 e 4 h) após a injeção de carragenina. Os dados foram expressos em percentagens depois de calcular o índice de edema ((Chertov *et al.*, 2000)

#### 2.4.3 Indução de granuloma por corpo estranho

O método adotado para formação de granuloma seguiu o descrito por Swingle e Shideman (1972) com algumas modificações. Os animais foram previamente anestesiados com solução de cloridrato de xilazina 2 (Rompun, Bayer S.A, Brasil) (20 mg/ kg) e cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol, König S.A, Argentina) (25 mg/kg), à proporção de 2:1 respectivamente via intramuscular (i.m.). Em seguida, foi feita uma pequena incisão na pele da região dorsal para implante subcutânea de algodão (0,001g), previamente esterilizado e pesado. Os camundongos foram tratados com 100 µL da fração nas doses de 0.5, 1 ou 5 mg/kg, dexametasona (2mg/kg) ou água destilada, apenas por via oral durante 17 dias consecutivos. No 18º dia, os animais foram sacrificados e os implantes de algodão foram retirados e pesados para obtenção do peso úmido.

Após a obtenção do peso seco, os implantes de algodão foram então dessecados em estufa à 37°C durante 48 horas. A partir do peso final foi calculado o peso do granuloma utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso do granuloma (seco ou úmido)} = P_F - P_I$$

Onde  $P_F$  é o peso final da bola de algodão e  $P_I$  é o peso inicial da bola de algodão.

### 2.5 Obtenção e contagem de células linfóides

#### 2.5.1 Células do baço

Os órgãos dos animais que desenvolveram granuloma por corpo estranho foram removidos e pesados. Logo após, as células esplênicas foram obtidas após trituração em tamis utilizando-se 5 mL de PBS (tampão fosfato de potássio 10 mM NaCl 0,14 M, pH 7,4). Em seguida, o material obtido foi colocado em tubos de polipropileno com fundo cônico (Costar). As células foram coradas

com solução de cristal violeta 0,05% em ácido acético 30% e contadas em câmara de Neubauer (Sigma) com auxílio de microscópio óptico de luz.

### 2.5.2 Células da medula óssea

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

### 2.5.3 Células dos linfonodos

Os linfonodos inguinais dos animais que desenvolveram granuloma foram pesados e depois triturados em 1 mL de PBS estéril, colocados em tubos do tipo Eppendorf e mantidos em banho de gelo ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) até a realização da contagem total de células. As células foram coradas com solução de cristal violeta 0,05% em ácido acético 30% e contadas em câmara de Neubauer (Sigma) com auxílio de microscópio óptico de luz.

## 2.6 Coleta de sangue e análise de citometria de fluxo

Para a quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$  foi utilizada a técnica de CBA, ensaio citométrico de esferas ordenadas. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do kit – Mouse Inflammation Kit, obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA).

Os soros foram centrifugados à 1200 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foram adicionados 25 µL da amostra padrão fornecida pelo fabricante ou dos plasmas a serem testados. Em seguida receberam 25 µL de cada reagente “cytokine beads” para marcar a produção de cada citocina e 25 µL de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Os poços foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após o período de incubação as amostras foram ressuspensas com 300 µL de solução tampão. Posteriormente a placa foi centrifugada por 10 minutos à 453 rpm e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 150 µL de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

## 2.7 Análise estatística

Os dados estão expressos como média ou média + desvio padrão. A análise estatística foi feita por teste t de Student, sendo o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Análise Fitoquímica: avaliação qualitativa

Os ensaios para avaliação qualitativa dos constituintes químicos da fração acetato de etila das folhas de *Dysphania ambrosioides* L. indicaram resultados negativos para fenóis, taninos hidrolisáveis, antocianinas e antocianidinas, flavonas, xantonas e flavonoides, chalconas e auronas, flavonois, leucoantocianidinas, catequinas e terpenos (triterpenoides). E apresentaram reação positiva para taninos condensados, flavononas, cumarinas, alcaloides, saponina e esteroides.

Espécies vegetais ricas em taninos possuem alta complexidade, sugere-se que os possíveis mecanismos de ação dos taninos no organismo estejam relacionados a três propriedades: a complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de complexar com macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (NIEMETZ; GROSS, 2005). No organismo humano atuam como antioxidante, antisséptico, cicatrizante e vasoconstritor. Em excesso podem reduzir significativamente a biodisponibilidade mineral e a digestibilidade proteica da refeição (COZZOLINO, 2009). A complexação das saponinas com o colesterol, propriedade marcante atribuída às 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, 2007). As saponinas são compostos que apresentam propriedades detergentes e surfactantes. Dentre seus efeitos no organismo humano destacam-se os antioxidantes, em que se ligam a sais biliares e colesterol no tubo digestivo, impedindo sua absorção, além disso, possuem ação citotóxica atuando contra células tumorais (SCHENKEL et al., 2007).

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, e encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos. São pigmentos naturais importantes e nas plantas tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (LOPES et al. 2010). Entre os flavonoides com ação medicinal estão os flavonóis, que demonstra ter grande potencial anti-inflamatório (QUEIROZ et al., 2014; TODOROVA; TRENDALFOLOVA, 2014).

As cumarinas são bastante exploradas em química medicinal e tem suas propriedades biológicas reconhecidas (BUBOLSA et al., 2013). Tais moléculas possuem uma extensa variedade

de atividades farmacológicas como antitumorais, antidiabéticas, antioxidantes, antimicrobianas, anticolinesterásicas, anti-inflamatórias entre outras, cumarinas se destacam como antioxidantes promissores com interesse farmacológico. (VIANNA et al., 2012). Esteroides e alcaloides, livres ou na forma de heterosídeos, metabólitos secundários estruturalmente diversificados e complexos. Estes compostos, em geral, são de interesse terapêutico, visto que apresentam diversas atividades, como citotóxica, anti-inflamatória e antiulcerogênica (PINTO et al., 2010).

**Tabela 1.** Avaliação qualitativa dos constituintes químicos do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila desse EH de *Dysphania ambrosioides* L. obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:4

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

Crterios 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 na fração acetato de etila, de *Dysphania ambrosioides* obtidos por percolação de hidromódulo 1:4 (P 1:4).

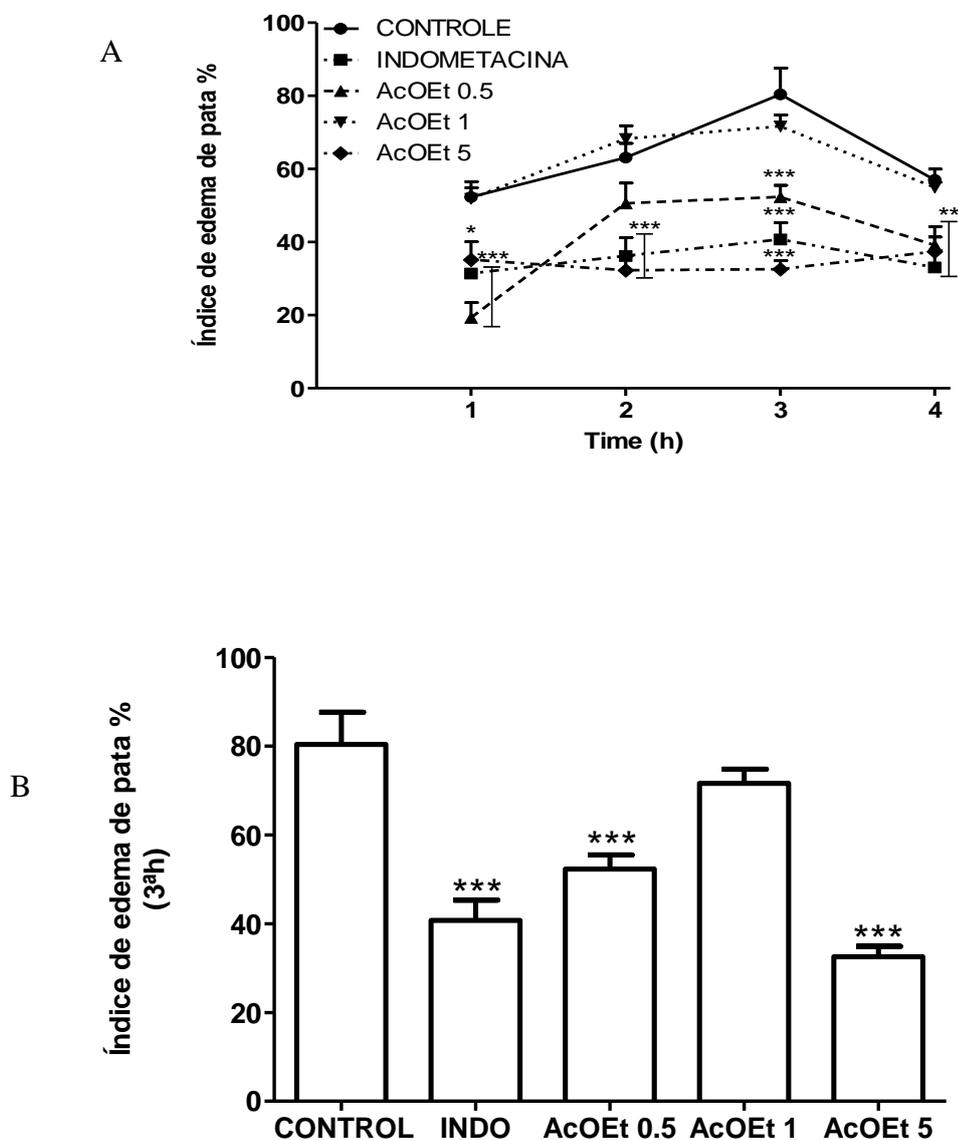
### 3.2 Avaliação biológica

#### 3.2.1 Edema de pata

No modelo de edema de pata, ao injetar-se carragenina foi provocado o estado inflamatório agudo. Observou-se que a ACoEt inibiu significativamente o edema de pata de camundongos do grupo FACoEt5 apenas às 3 h (42,5%) em comparação ao grupo controle.

Este modelo, que simula a fase aguda da inflamação, é sensível aos anti-inflamatórios não-esteroidais e é caracterizado por duas fases distintas. Na primeira fase, durante a primeira hora, há liberação de histamina e serotonina (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2007). A segunda fase, no prazo de 6 h, está associada ao aumento da produção de ciclooxigenase indutível e, assim, aumenta a síntese de prostaglandinas, bem como a produção de radicais livres derivados de oxigênio (PANTHONG et al., 2004). Este modelo tem sido uma ótima ferramenta para testar novos medicamentos anti-

inflamatórios. Os dados aqui apresentados indicam que o tratamento com doses de 1 mg / kg ou 5 mg / kg de AcOEt, bem como com indometacina, foi eficaz durante todo o processo edematogênico. O efeito anti-edematogênico da AcOEt pode estar relacionado à sua possível ação sobre mediadores químicos envolvidos na via da ciclooxigenase.



**Figura 1. Efeito do tratamento com AcOEt do EBH de *Dysphania ambrosioides* L. sobre indução de edema de pata.** Camundongos SW foram tratados com 100  $\mu$ L por via oral com 0.5, 1 ou 5 mg / kg de doses da fração acetato de etila, indometacina (10 mg / kg) ou água destilada (grupo controle) 1 h antes da indução de edema. O inchaço da pata foi induzido pela injeção intraplantar de 50  $\mu$ L de carragenina a 1% na pata traseira esquerda. As patas foram medidas com pletismômetro, 0, 1, 2, 3 e 4 h após a indução. (A) Índice do desenvolvimento do edema de pata. (B) Desenvolvimento do edema de pata no pico da inflamação (3h). Os dados representam a média do índice de edema da pata  $\pm$  \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$  em comparação ao grupo controle pelo teste t de Student.

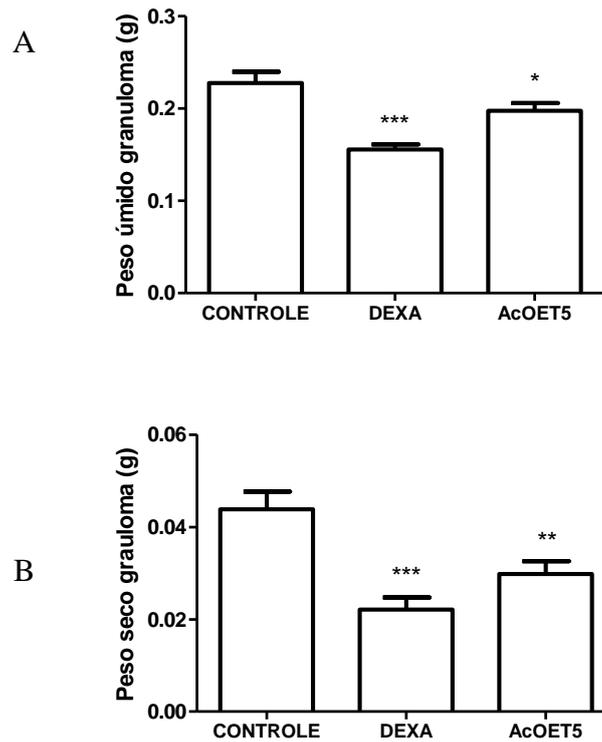
### 3.2.2 Granuloma

O tratamento feito via oral com três doses de AcOEt (0.5, 1 ou 5 mg/kg) sobre processos inflamatórios agudo (modelo edema de pata), induzido pela Carragenina, promovendo assim maior efeito nos animais tratados com dose 5 mg/kg. Portanto, a pesquisa prosseguiu apenas com a dose de AcOEt 5 sendo testada no modelo de granuloma por corpo estranho ao longo dos 17 dias, no processo inflamatório crônico.

No granuloma por corpo estranho, o efeito anti-inflamatório do fármaco pode ser avaliado pelos pesos úmido e seco do implante após o sacrifício dos animais (SWINGLE; SHIDMAN, 1972; KARTHIKEYAN; DEEPA, 2011). Alguns eventos inflamatórios que ocorrem durante o implante de pellets de algodão são caracterizados pela infiltração de macrófagos, leucócitos, células fibroblásticas, acúmulo de fluidos e proteínas (ISMAIL et al., 1997).

No modelo de granuloma, animais tratados com AcOEt 5 por 17 dias apresentaram inibição significativa tanto no peso de edema (13,1%) quanto do peso de células (32,0%) no granuloma (Figura 2 A e B). Esse tratamento diminuiu os pesos úmido e seco, entretanto a diminuição foi mais significativa em relação ao peso seco.

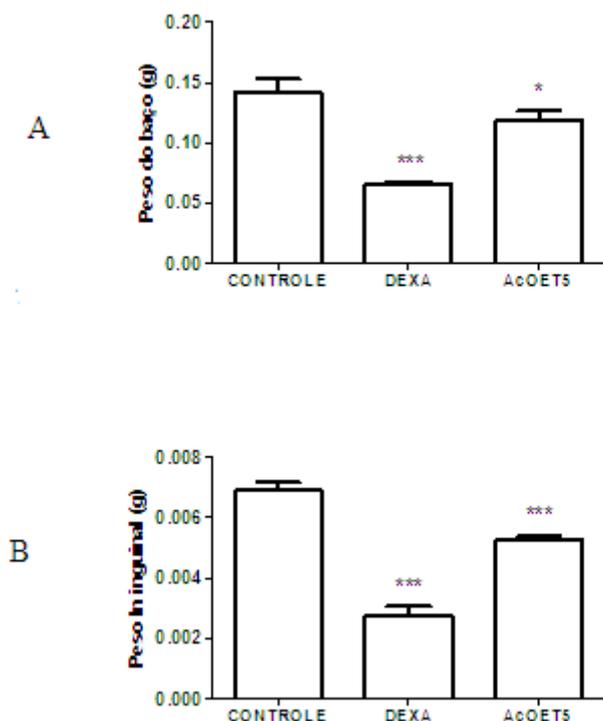
Os pesos secos das pelotas de algodão têm uma correlação direta com a quantidade de formação de tecido granulomatoso. Este parâmetro pode refletir em grande medida a eficácia do tratamento através da redução da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno e mucopolissacáridos, que são eventos naturais de formação de tecido de granulação (MANDAL et al., 2000).



**Figura 2. Efeito do tratamento com AcOEt do EBH de *Dysphania ambrosioides* L. sobre a formação de granuloma por corpo estranho.** Camundongos SW foram tratados por via oral por 17 dias com 100  $\mu$ L de AcOEt (5mg/kg), ou dexametasona (2 mg / kg), enquanto o grupo controle recebeu água destilada. O peso molhado e seco foram determinados como descrito nos métodos. (A) Peso úmido do granuloma. (B) Peso seco do granuloma. de três experimentos independentes (n = 5 / grupo). \*  $p \leq 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.2.3 Peso da Células dos Órgãos Linfoides

Ao avaliar os parâmetros imunológicos dos animais com granuloma tratados com 5 mg/kg da AcOEt, observou-se que o tratamento promoveu diminuição significativa de 16,6% do peso do baço e 26,7% no peso do linfonodo inguinal (Figura 3A e B). Possivelmente, a AcOEt seja capaz de interferir direta na ativação, proliferação e migração de células do sistema imune, apresentando assim um efeito supressor.



**Figura 3. Efeito do tratamento com ACoET do EBH *Dysphania ambrosioides* L. sobre o peso dos órgãos linfoides de animais com formação do granuloma.** Camundongos SW foram tratados por via oral por 17 dias com 100  $\mu$ L de ACoET, ou dexametasona (2 mg / kg), enquanto o grupo controle recebeu água destilada. (A) Peso do baço. (B) Peso do linfonodo inguinal. Dados representam a média  $\pm$  de três experimentos independentes (n = 5 / grupo). \*  $p \leq 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

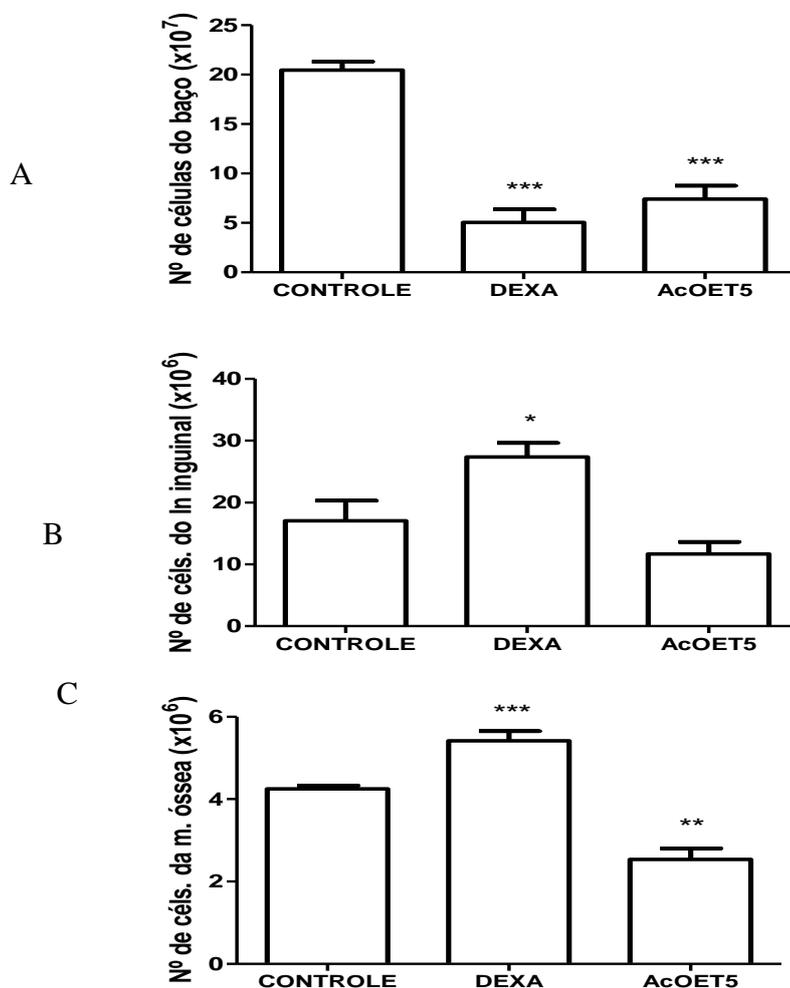
### 3.2.4 Número de Células dos Órgãos Linfoides

Em relação a contagem de células da medula óssea, baço e linfonodo inguinal, observou-se que no grupo tratado com AcOEt 5 houve diminuição significativa de 63,8% no número de células esplênicas e 40,3% no número de células na medula óssea, mas não houve alteração no número de células no linfonodo inguinal, apesar de apresentar menos células em relação ao grupo controle (Figura 4). Estes resultados sugerem que a AcOEt 5 possivelmente interfere na proliferação e migração de células inflamatórias.

A inibição do desenvolvimento do granuloma pela AcOEt está provavelmente relacionada aos seus constituintes químicos. A investigação fitoquímica dos extratos de *D. ambrosioides* mostrou a presença de, entre outros, taninos, saponinas, e cumarinas. Uma vez que existem muitas evidências da relação entre a eliminação de radicais livres e as atividades antiinflamatórias, pode-se concluir que os antioxidantes desempenham um papel benéfico no tratamento de doenças inflamatórias (CONNER e GRISHAM, 1996).

Esses compostos podem agir inibindo a oxidação-redução de enzimas como a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LPX), indicando ser esse o mecanismo de ação anti-inflamatória (BAUMANN, et al., 1980; SEKIYA et al., 1982). A COX é uma enzima responsável pela conversão

de ácido araquidônico em prostaglandinas, tais como PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , mediadores de inflamação e dor, assim como citocinas pró-inflamatórias. Esses mediadores estão envolvidos com a manutenção do processo inflamatório, como a permanência da vasodilatação, o que permite contínuo extravasamento de edema e migração celular.



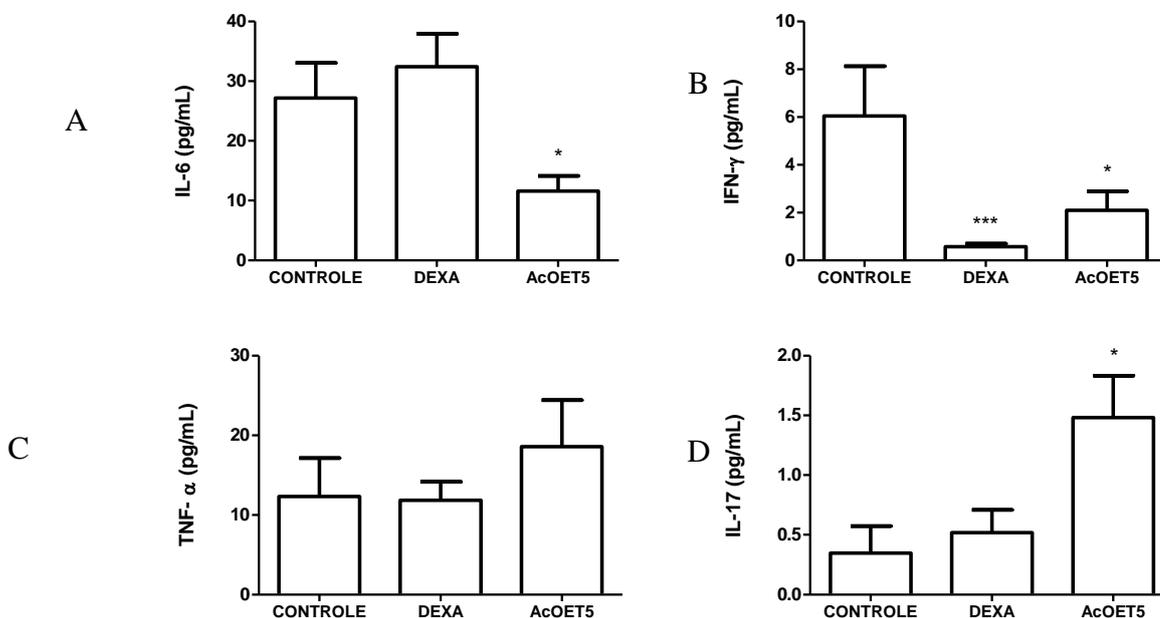
**Figura 4. Efeito do tratamento com AcOET do EBH de *Dysphania ambrosioides* L. sobre o número de células dos órgãos linfoides de animais com formação do granuloma.** Camundongos Swiss tratados por via oral durante 17 dias a cada com doses 5.0 mg / kg da AcOEt água apirogênica (Controle) tiveram contadas as células totais do baço e medula óssea. Número de células do baço (A), linfonodo inguinal (B) e medula óssea (C). Os dados representam a porcentagem de células do grupo AcOEt 5.0 em relação ao grupo controle, de três experimentos independentes (n = 5 / grupo)

### 3.2.5 Citocinas

Para esse teste foram dosadas as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ . Foram verificadas inibições de 65,3% dos níveis de IFN- $\gamma$  e 57,3% de IL-6, apenas, presentes no soro sanguíneo.

A reação granulomatosa ao corpo estranho é dependente de processos imunológicos, com infiltração celular resultante do recrutamento de mediadores químicos, como as citocinas pró-inflamatórias, produzidas principalmente por macrófagos e neutrófilos. Devido à sua origem comum, macrófagos e neutrófilos compartilham várias funções, como fagocitose de patógenos invasores, ação

cinética semelhante durante infecções ou inflamação e propriedades imunomoduladoras, como a capacidade de ativar e liberar quimiocinas que recrutam monócitos / macrófagos para o local da inflamação. (SILVA, 2010). O IFN- $\gamma$ , produzido principalmente por neutrófilos e células T, suporta o progresso da resposta inflamatória, que também inclui a formação de granuloma (SAUNDERS BRITTON, 2007; AHMAD, 2011). O IFN- $\gamma$  ativa macrófagos, aumentando suas funções fagocíticas e microbicidas, promove também a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e fatores de crescimento (GM-CSF e FGF-b) que estão envolvidos na diferenciação celular e envelhecimento no tecido inflamatório (AHMAD, 2011). Neste trabalho, notou-se que a AcOEt 5 reduziu significativamente o nível sérico de IFN- $\gamma$ , o que impediria o recrutamento de novas células para o foco inflamatório e posterior formação de granuloma.



**Figura 5. Efeito do tratamento com AcOET do EBH de *Dysphania ambrosioides* sobre o perfil de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$ .** Camundongos Swiss machos tratados por via oral com água estéril (CONTROLE), dexametasona (DEXA) ou FAcOET na dose de 5 mg/kg (AcOET5). No 18º dia, o soro sanguíneo foi obtido para a determinação do perfil de citocinas (A) IL-6, (B) IFN- $\gamma$ , (C) TNF- $\alpha$  e (D) IL-17. Dados representam a média  $\pm$  S.E.M. de três experimentos independentes (n = 5 / grupo). \* p  $\leq$  0,05 e \*\*\* p  $\leq$  0,001 em comparação com o grupo controle por Dunnett teste.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através dos modelos de edema pata e granuloma mostraram que a dose de 5mg/kg de FAcOET apresenta efeito anti-inflamatório, intervindo nos processos edematogênicos na fase aguda e na migração de macrófagos para a formação granulomatosa, provavelmente mediados pelo bloqueio de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e IFN- $\gamma$ .

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, S., 2011. **Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection.** *Clinical and Developmental Immunology*. 2011, Article ID 814943, 17 pages.
- BARROS, L., PEREIRA, E., CALHELHA R. C., DUEÑAS, M., CARVALHO, A. M., SANTOS-BUELGA, C. FERREIRA, I.C.F.R., 2013. **Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L.** *Journal of Functional Foods*. 5, 1732-1740.
- BUBOLSA, B.G. et al. 2013. **The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoid.** *Mini- Rev. Med. Chem.*, v. 13, p.318-334.
- BAUMANN, J; WURM, G; BRUCHHAUSEN, FV. *ARCH PHARM. (WEINHEIM)*, 313, 330, 1980. BOGACHEVA NG; KOGAN LM; LIBIZOV NI. **Triterpenoid glycosides from *Chenopodium ambrosioides*.** *Khim. Prir. Soedin*, 3:395, 1972.
- CHERTOV, O., YANG, D., HOWARD, O. M., OPPENHEIN, J. J. **Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses.** *Immunol. Rev.* 177: 68-78, 2000.
- CONNER, E.M., GRISHAM, M.B., 1996. **Inflammation, free radicals and antioxidants.** *Nutrition*. 12, 274-277.
- CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V.; PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; SOUSA, S. M.; FRAZÃO, J. B.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; MACIEL, M. C.; SILVA, L. A.; AMARAL F. M.; BARROQUEIRO, E. S.; GUERRA, R. N.; NASCIMENTO, F. R - 2007. **Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves.** *Journal of Ethnopharmacology*, 111:148–154.
- DÉCIGA-CAMPOS, M., PALACIOS-ESPINOSA, J.F., REYES-RAMÍREZ, A., MATA, R., 2007. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillariadensa*.** *Journal of Ethnopharmacology*. 114, 161-168.
- GADANO, A.B., GURNI, A.A., CARBALLO, M.A. 2006 **Argentine folk medicine: genotoxic effects of *Chenopodiaceae* family.** *Journal of Ethnopharmacology*. 103, 246-251.
- JARDIM C, JHAM G, DHINGRA O, FREIRE,M; , 2008. **Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L.** *J Chem Ecol* ;34:1213-1218,

KUNKEL, E. J., BUTCHER, E. C. 2002. **Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes.** *Immunity*, 16: 1-4.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.D., NAGEM, T.J., PINTO, A.D.S; 2010;3(14). **Flavonóides. Biotecnologia Ciência& Desenvolvimento.**

LIMA JUNIOR, J. A. C; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; BEZERRA, J. L.; PATRÍCIO, F. J. B.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; NASCIMENTO, F. R. F. 2014 **Inibição da infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides* L.** *Rev. Ciênc. Saúde*, São Luís, v.16, n.1, p. 46-53, jan-jun.

LIN E, CALVANO SE, LOWRY SF – 2000. **Inflammatory cytokines and cell response in surgery.** *Surgery*;127:117-126.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z., NEDIALKOV, P.T., NIKOLOV, S.D., 2009. **The genus *Chenopodium*: phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology.** *Pharmacognosy Review*. 3, 280-306.

KARTHIKEYAN, M; DEEPA, MK; 2011 **Anti-inflammatory activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) roottl and wild leaves extracts in Wistar albino rats.** *Asian Pac J Trop Med* 510-513.

ISMAIL, T. S., GAPALAKRISAN, S., BEGUM, V. H., ELANGO, V., 1997. **Anti-inflammatory activity of *Salaciaoblunga* wall and *Azimatetracantha* Lam.** *Journal of Ethnopharmacology*. 56, 145-152.

LORENZI H.; MATOS F. J. A. 2002**Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

MANDAL, S.C., MAITY, T.K., DAS, J., SABA, B.P., PAL, M. 2000. **Anti-inflammatory evaluation of *Ficus racemosa* Linn. Leaf extract.** *Journal of Ethnopharmacology*. 72, 87-92.

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. 2006 **Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment.** *Life Sciences*. 78, 2650-2653.

NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M. N. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; MORAES-COUTINHO, D.; NASCIMENTO, F. R. F.; REIS, A. S.; AMARAL, F. M. M.( 2011) **Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos.** *Revista Ciências da Saúde* v.13, n. 2, p. 155-165, jul-dez.

NIEMETZ, R. E GROSS, G. G. (2005), **Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis.***Phytochemistry*, 66, 2001-2011.

PANTHONG, A., KANJANAPOTHI, D., TAESOTIKUL, T., PHANKUMMOON, A., PANTHONG, K., REUTRAKUL, V., 2004. **Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmandiana* Pierre.** *Journal of Ethnopharmacology*. 91, 237-242.

PATRÍCIO, F. J., COSTA, G. C., PEREIRA, P. V., ARAGÃO-FILHO, W.C., SOUSA S. M., FRAZÃO J. B., PEREIRA, W.S., MACIEL, M. C., SILVA, L. A., AMARAL, F. M., REBÊLO, J. M., GUERRA, R. N., RIBEIRO, M. N, NASCIMENTO, F. R. 2008 Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**; 115(2): 313–319.

PEREIRA, W. S. **Avaliação do efeito do extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* sobre o desenvolvimento da artrite experimental**. 2014. 131f. Tese em Biociências - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PEREIRA, W.S. *Chenopodium ambrosioides* L; 2009. **Avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória**. Dissertação de conclusão de curso (Pós-graduação-Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão.

QUEIROZ A.C., ALVES H.D.S., CAVALCANTE-SILVA L.H.A., DIAS T.D.L.M.F., SANTOS M.D.S., MELO G.M.D.A., ALEXANDRE-MOREIRA M.S; 2014;28(6):403-6. doi:10.1080/14786419.2013.867444 **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice**. **Nat Prod Res**.

SAUNDERS, B.M., BRITTON, W.J., 2007. **Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis**. **Immunology and Cell Biology**. 85, 103-111.

SEKIYA, S; OKUDA, H. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 105, 1090, 1982. SHINWARI, MI; KHAN, MA. **Folk use of medicinal herbs of Margalla Hills National Park, Islamabad**. **J. Ethnopharmacol**. 69: 45 – 56, 2000

SILVA, D.L.F; BRAGA FILHO, JAF; SOUSA, AKS; FORTES, T; AMARAL, F.M. M; SILVA, LA; GUERRA, R.N.M; GONÇALVES FILHO, A; PEREIRA, WS; NASCIMENTO, F.R.F. 2015 **Potencial anti-inflamatório das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. no modelo de cistite hemorrágica em camundongos**. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.17, n.1, p. 1, jan-jun,

SOUSA, L. H. A.; RIOS, C. E. P.; ASSUNÇÃO, AKM; FIALHO, EMS; COSTA, GC; NASCIMENTO, F.R.F. 2012 **Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos**. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.14, n.1, p. 73-82, jan-jun.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. DE; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) 2001 **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 41-62

SWINGLE, K.F., SHIDEMAN, F.E. 1972 **Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents**. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic** 183, 226-2.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. 2007, *SAPONINAS*.IN:SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**.6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1104p.

TODOROVA,M.; TRENDAFILOVA,A; 2014 **Sideritis scardica Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity.** **J Ethnopharmacol.** ;152(2):256-265.

TRIVELLATO-GRASSI, L.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z. S.; MONGUILHOT, E. D.; FRODE, T. S.; et al. 2013 **From popular use to pharmacological validation: A study of the antiinflammatory, anti-nociceptive and healing effects of 67 *Chenopodium ambrosioides* extract.** *Journal Ethnopharmacology*, 145: 127–138.

VIANNA, D.R. et al. 2012 **Evaluation of the Antioxidant Capacity of Synthesized Coumarins.** *J.Mol Sciences.*, v. 13, p. 7260 – 7270.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; & NUSS, G.W.; 1963 **Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin. 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indoie-3-acetic acid.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 141:369-76.

## INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

### **Introdução**

A Revista Brasileira de Farmacognosia - Revista Brasileira de Farmacognosia é um periódico dedicado à publicação de trabalhos científicos originais, revisões e comunicações no campo da Farmacognosia (o estudo de drogas brutas e substâncias derivadas de fontes naturais usadas como medicamentos).

### **Tipos de artigos**

A Revista Brasileira de Farmacognosia aceita para publicação trabalhos científicos originais, revisões e artigos de comunicação escritos **apenas** em inglês.

- *Artigos originais:* Artigos originais são artigos de pesquisa que descrevem resultados experimentais originais. O manuscrito deve ser organizado na seguinte ordem: **Resumo gráfico**, Título, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Autoria, Referências, Figuras com Legendas, Tabelas, Fórmulas Estruturais e Arquivos Complementares (se aplicável). As seções Resultados e Discussão podem aparecer como uma seção combinada 'Resultados e Discussão'. A duração normal do texto principal de um documento original (excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras) é de aproximadamente 3.000 palavras. Manuscritos mais longos podem ser aceitos somente em casos excepcionais e bem justificados.

- *Comunicações breves:* Esta seção cobrirá principalmente o isolamento de compostos conhecidos de novas fontes neotropicais ou resultados complementares de trabalhos em andamento. O texto deve ser organizado da seguinte forma: Resumo gráfico, Título, Resumo de 200 palavras, Palavras-chave, Observações introdutórias, Material e Métodos com breves detalhes experimentais sem subtítulos, Resultados e Discussão como um corpo de texto sem manchetes, Agradecimentos, Autoria, Referências (até 20 citações) e figuras e / ou tabelas (até 3). O texto não deve exceder 2.000 palavras.

- *Comentários:* Os autores são convidados a enviar um artigo de revisão que forneça atualizações concisas e críticas sobre um assunto e com cerca de 100 referências. O objetivo principal das revisões é fornecer uma introdução concisa e precisa ao assunto e informar ao leitor criticamente os últimos desenvolvimentos no campo. Eles devem ser concisos e incluir detalhes da estratégia de pesquisa usada, como período de tempo, termos de pesquisa, bancos de dados usados. Uma revisão deve ser um artigo que produz conhecimento e não apenas um tipo de levantamento da literatura

existente. A revisão deve ser uma resposta a uma pergunta inicial. As revisões de um determinado medicamento à base de plantas serão consideradas se contiverem o assunto mais recente e uma perspectiva sobre direções futuras.

Recomenda-se vivamente aos autores que preparem um manuscrito em papel de tamanho A4, em espaço duplo, com fonte Times New Roman tamanho 12, totalmente justificado, com margens de 2 cm.

### **Lista de verificação de envio**

Você pode usar essa lista para realizar uma verificação final do seu envio antes de enviá-lo ao periódico para análise. Por favor, verifique a seção relevante neste Guia para Autores para mais detalhes.

#### **Assegure o seguinte :**

- Um autor foi designado como o autor correspondente com detalhes de contato: endereço de e-mail institucional; endereço postal completo.
- Todos os autores, com seus respectivos endereços de e-mail, devem ser inseridos no sistema.
- Todos os arquivos necessários foram enviados: Resumo gráfico, Manuscrito; Inclua palavras-chave; Todas as figuras com Legends; Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé); e arquivos suplementares (se aplicável).
- Todas as citações de figura e tabela no texto correspondem aos arquivos fornecidos;
- O manuscrito foi 'verificado ortograficamente' e 'verificado a gramática';
- Todas as referências mencionadas na Lista de Referência são citadas no texto e vice-versa;
- Permissão foi obtida para uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet);
- Declarações de interesse relevantes foram feitas;
- As políticas de diário detalhadas neste guia foram revisadas.

#### **Antes de você começar**

#### **Ética na publicação**

Por favor, consulte nossa página de informações sobre diretrizes éticas para publicação em periódicos .

#### **Direitos humanos e animais**

Se o trabalho envolver o uso de seres humanos, o autor deve garantir que o trabalho descrito foi realizado de acordo com o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) para experimentos envolvendo seres humanos; Requisitos uniformes para manuscritos submetidos a revistas biomédicas . Os autores devem incluir uma declaração no manuscrito que o consentimento informado foi obtido para a experimentação com seres humanos. Os direitos de privacidade dos seres humanos devem sempre ser observados.

Todos os artigos que envolvam estudos com seres humanos ou animais devem ter a aprovação e autorização dos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais da instituição à qual pertence o (s) autor (es).

### **Declaração de interesse**

Todos os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações que possam influenciar de forma inadequada (enviesar) o seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesses incluem emprego, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunho de perito pago, pedidos / registros de patentes e subsídios ou outro financiamento. Se não houver conflitos de interesses, por favor declare isto: 'Conflitos de interesse: nenhum'. Para mais informações, entre em contato com o Editor Managin na revista@sbfgnosia.org.br.

### **Declaração de submissão e verificação**

A submissão de um artigo implica que o trabalho descrito não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de um resumo ou como parte de uma dissertação publicada ou tese acadêmica ou como uma pré-impressão eletrônica, que não está sob consideração para publicação em outro lugar). A publicação é aprovada por todos os autores e tacitamente ou explicitamente pelas autoridades competentes onde o trabalho foi realizado e que, se aceita, não será publicada em outro lugar da mesma forma, em inglês ou em qualquer outro idioma, inclusive eletronicamente sem o consentimento por escrito do detentor dos direitos autorais. Para verificar a originalidade, seu artigo pode ser verificado pelo serviço de detecção de originalidade CrossCheck .

### **Colaboradores**

Cada autor é obrigado a declarar sua contribuição individual ao artigo: todos os autores devem ter participado materialmente da pesquisa e / ou da preparação do artigo, portanto, os papéis de todos os autores devem ser descritos. A afirmação de que todos os autores aprovaram o artigo final deve ser verdadeira e incluída na divulgação.

### **Autoria**

Todos os autores deveriam ter feito contribuições substanciais para todos os seguintes: (1) a concepção e concepção do estudo, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados, (2) elaboração do artigo ou revisão crítica para conteúdo intelectual importante. , (3) aprovação final da versão a ser apresentada.

### **Mudanças na autoria**

Espera-se que os autores considerem cuidadosamente a lista e a ordem dos autores **antes de** submeter seu manuscrito e forneçam a lista definitiva de autores no momento da submissão original. Qualquer adição, exclusão ou rearranjo de nomes de autores na lista de autoria deve ser feita somente **antes que** o manuscrito tenha sido aceito e somente se aprovado pelo Editor da

revista. Para solicitar tal alteração, o Editor deve receber o seguinte do **autor correspondente**: (a) o motivo da mudança na lista de autores e (b) confirmação por escrito (e-mail, carta) de todos os autores que concordam com a adição, remoção ou rearranjo. No caso de adição ou remoção de autores, isso inclui a confirmação do autor que está sendo adicionado ou removido. Somente em circunstâncias excepcionais, o Editor considerará a adição, exclusão ou rearranjo de autores **após** a aceitação do manuscrito. Enquanto o Editor considerar a solicitação, a publicação do manuscrito será suspensa. Se o manuscrito já tiver sido publicado em uma edição on-line, quaisquer solicitações aprovadas pelo Editor resultarão em uma corrigenda.

### **Serviço de Transferência de Artigo**

Esta revista faz parte de um Serviço de Transferência de Artigo. Isso significa que, se o Editor achar que seu artigo é mais adequado em outros periódicos participantes, talvez seja necessário considerar a possibilidade de transferir o artigo para um desses periódicos participantes. Se você concordar, seu artigo será transferido automaticamente em seu nome sem necessidade de reformatar. Por favor, note que seu artigo será revisado novamente pelo novo periódico.

### **Copyright**

Após a aceitação de um artigo, os autores serão solicitados a preencher um 'Contrato de publicação de periódico' (veja [mais informações](#) sobre este assunto) para atribuir à Sociedade Brasileira de Farmacognosia os direitos autorais do manuscrito e quaisquer tabelas, ilustrações ou outro material enviado para publicação como parte do manuscrito (o "Artigo") em todas as formas e mídias (conhecidas ou desenvolvidas posteriormente), em todo o mundo, em todas as línguas, pelo termo completo de direitos autorais, vigente quando o Artigo for aceito para publicação. Um e-mail será enviado ao autor correspondente confirmando o recebimento do manuscrito juntamente com o formulário 'Journal Publishing Agreement' ou um link para a versão on-line deste contrato.

### *Direitos*

*autorais*

Como autor, você (ou seu empregador ou instituição) tem certos direitos para reutilizar seu trabalho.

### **Papel da fonte de financiamento**

Você é solicitado a identificar quem forneceu apoio financeiro para a realização da pesquisa e / ou preparação do artigo e descrever brevemente o papel do (s) patrocinador (es), se houver, no desenho do estudo; na coleta, análise e interpretação de dados; na redação do relatório; e na decisão de submeter o artigo para publicação. Se a (s) fonte (s) de financiamento não teve tal envolvimento, então isso deve ser declarado.

### **Acesso livre**

Este é um diário de acesso aberto: todos os artigos serão imediata e permanentemente gratuitos para que todos possam ler e baixar.

### **Artigo Processando Encargos**

A Sociedade Brasileira de Farmacognosia (SBFgnosia) paga a maior parte dos custos de publicação incorridos pela revista. Porém, os autores devem pagar uma pequena taxa de publicação à Sociedade Brasileira de Farmacognosia para compartilhar os custos de produção:

Os pagamentos serão recebidos através do sistema PayPal para o exterior, que é um serviço seguro, flexível e bem estabelecido para pagamentos on-line ou por transferência bancária. Autores brasileiros poderiam fazer um depósito / transferência bancária para a conta do Banco do Brasil.

Sociedade Brasileira de Farmacognosia (CNPJ: 76.259.381 / 0001-90)

Taxas de processamento:

- Autor correspondente não-membro da SBFgnosia: US \$ 450
- Membro de autor correspondente da SBFgnosia: US \$ 350
- Membro autor correspondente da SBFgnosia há mais de dois anos consecutivos US \$ 300
- Autor correspondente: membro da SBFgnosia há mais de cinco anos consecutivos R \$ 250,00

Um número limitado de dispensas por taxas de processamento de artigos também está disponível a critério dos editores, e os autores que desejarem solicitar essas dispensas devem entrar em contato com os editores antes de enviar seus manuscritos.

Editores e revisores não têm acesso para saber se os autores podem pagar; A aceitação de um manuscrito é baseada exclusivamente em critérios científicos de qualidade, novidade e relevância.

A (re) utilização de terceiros permitida é definida pelas seguintes licenças de usuário da Creative Commons : *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

Para fins não comerciais, permite que outras pessoas distribuam e copiem o artigo e incluam em um trabalho coletivo (como uma antologia), desde que creditem o (s) autor (es) e desde que não alterem ou modifiquem o artigo.

### ***Serviços de idiomas***

Por favor, escreva seu texto em bom inglês (o uso americano ou britânico é aceito, mas não uma mistura destes). Os autores que sentirem que seu manuscrito em inglês pode exigir edição para eliminar possíveis erros gramaticais ou ortográficos e para se adequar ao inglês científico correto podem desejar usar o serviço de edição em inglês disponível na página da revista.

### **Submissão**

Nosso sistema de submissão on-line o orienta passo a passo no processo de inserir os detalhes do seu artigo e fazer o upload dos seus arquivos. O sistema converte seus arquivos de artigo em um

único arquivo PDF usado no processo de revisão por pares. Os arquivos editáveis (*por exemplo*, Word, LaTeX) são necessários para compor seu artigo para publicação final. Toda a correspondência, incluindo a notificação da decisão do Editor e os pedidos de revisão, é enviada por e-mail.

Envie seu artigo por meio de: <https://www.eviser.com/eviser/jrnl/BJP>.

### **Informações adicionais**

- Todos os materiais de plantas, microorganismos e organismos marinhos utilizados na pesquisa descrita devem ser apoiados por uma indicação do local (incluindo coordenadas de GPS, se possível) e país de origem, nome da pessoa que identifica o material biológico e a localização do espécime do comprovante.

- Os autores devem estar preparados para fornecer provas documentais de que a aprovação para a coleta foi fornecida por uma autoridade apropriada no país de coleta e, se aplicável, para seguir as regras relativas aos direitos de biodiversidade.

- A revista não se responsabilizará por trabalhos de pesquisa que não cumpram a legislação do país de residência do autor.

- Recomendamos enfaticamente que os autores evitem afirmar que o uso popular ou tradicional de uma determinada erva foi confirmado por testes pré-clínicos, *in vitro* ou *in vivo*, utilizando animais.

- A Revista Brasileira de Farmacognosia encoraja fortemente a submissão de trabalhos originais nos quais os procedimentos experimentais foram conduzidos levando em consideração princípios de química verde, tais como empregando solventes verdes e projetos experimentais de economia de recursos ambientais em qualquer etapa da investigação.

### **Os seguintes critérios de rejeição imediata se aplicam**

i. o manuscrito não se enquadra nas áreas de interesse da revista;

ii. manuscritos não formatados de acordo com os padrões da revista;

iii. os resultados do manuscrito são preliminares;

iv. manuscritos que relatam dados de atividades sem comparação com uma referência, sem controle positivo / controle apropriado ou não baseados em estatísticas adequadas;

v. a fonte biológica (por exemplo, planta, microorganismo, organismo marinho etc.) não está claramente identificada, autenticada e documentada;

vi. trabalho experimental sobre atividade antioxidante de extratos brutos sem isolamento, identificação e estimativa de conteúdo dos compostos ativos; compostos fenólicos são amplamente difundidos na natureza e totalmente reconhecidos como antioxidantes ou depuradores.

vii. trabalho experimental sobre atividade antimicrobiana com extratos brutos sem isolamento e

identificação dos compostos ativos, com grandes valores de CIM ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) para atividade antimicrobiana ( $\geq 250 \mu\text{g} / \text{ml}$  para extratos vegetais e  $\geq 50 \mu\text{g} / \text{ml}$  para compostos puros) e sem identificação apropriada de coleções de cultura / códigos de designação de tensão;

viii. trabalho experimental em óleos essenciais com apenas uma amostra de uma única planta com uma única análise cromatográfica e sem análises estatísticas apropriadas; sem rendimento de óleo (%) e caracterização e quantificação de componentes não realizados usando GC-MS-FID. Análises dos índices de retenção dos componentes não calculados usando séries homólogas de *n*-alcano juntamente com análises de alguns dos componentes naturais isolados. Atividade biológica do óleo essencial sem caracterização química.

ix. dados preliminares demais usando ensaios *in vitro* não serão aceitáveis se (i) nenhuma informação sobre o tipo de atividade for dada; (ii) dose única ou concentrações muito altas (deve mostrar estudos dose-resposta); (iii) repetição de um bioensaio simples (geralmente um ensaio com réplicas); (iv) falta de controles apropriados (solventes; substâncias positivas ou negativas de acordo com o estudo); (v) sem valores IC50 (se aplicável).

x. uso apenas do ensaio de *artemia de salmoura* (*Artemia salina*) para acessar a toxicidade dos extratos;

XI. isolamento e bioensaio de compostos bem conhecidos com pouca ou nenhuma relação com a atividade, ou para o uso medicinal da planta sem justificativa clara;

xiii. manuscritos relatando atividades farmacológicas ou biológicas de extratos brutos sem padronização química e técnica. A padronização dos extratos vegetais é considerada a descrição completa dos parâmetros de fabricação, tais como granulometria, relação solvente-planta, tempo de extração, composição do solvente, etc., juntamente com a quantificação do marcador e análises cromatográficas de impressões digitais.

Além dessas Diretrizes, um modelo (para artigos originais) está disponível em <http://www.sbfgnosia.org.br/revista/templates.html>.

### **Preparação**

#### ***Revisão por pares***

Esta revista opera um único processo de revisão cega. Todas as contribuições serão inicialmente avaliadas pelo editor para adequação à revista. Os documentos considerados adequados são então enviados a um mínimo de dois revisores especialistas independentes para avaliar a qualidade científica do artigo. O Editor é responsável pela decisão final sobre aceitação ou rejeição de artigos. A decisão do editor é final.

#### ***Uso de software de processamento de texto***

Independentemente do formato de arquivo do envio original, na revisão você deve nos fornecer um arquivo editável de todo o artigo. Mantenha o layout do texto o mais simples

possível. A maioria dos códigos de formatação será removida e substituída no processamento do artigo. O texto eletrônico deve ser preparado de maneira muito semelhante à dos manuscritos convencionais.

Para evitar erros desnecessários, é altamente recomendável usar as funções 'verificação ortográfica' e 'verificação gramatical' do seu processador de texto.

### **Estrutura do artigo**

O manuscrito deve ser organizado na seguinte ordem: **Resumo gráfico**, Título, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Autoria, Referências, Figuras com Legendas, Tabelas, Fórmulas Estruturais e arquivos Suplementares (se aplicável) .

### ***Subdivisão - seções não numerada***

Divida seu artigo em seções claramente definidas. Cada subseção recebe um breve título. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada. As subseções devem ser usadas o máximo possível ao cruzar o texto: consulte a subseção por cabeçalho, em vez de simplesmente "o texto".

### **Informações essenciais da página de título**

*Título:* Conciso e informativo. Títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.

*Nomes e afiliações dos autores:* Indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão escritos com precisão. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra em sobrescrito minúscula imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor. As afiliações dos autores devem ser apresentadas em ordem hierárquica decrescente (por exemplo, Harvard University, Harvard Business School, Boston, EUA) e devem ser escritas como estabelecido em seu próprio idioma (por exemplo, Université Paris-Sorbonne; Universidade de Harvard, Universidade de São Paulo).

*Autor para correspondência:* Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Assegure-se de que o endereço de e-mail institucional seja fornecido e que os detalhes de contato sejam mantidos atualizados pelo autor correspondente.

*Endereço presente / permanente:* Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava em visita no momento, um 'endereço atual' (ou 'endereço permanente') pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome desse autor. O endereço no qual o autor

realmente fez o trabalho deve ser mantido como o endereço principal de afiliação. Números árabes sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

### **Abstrato**

Um resumo estruturado de  $\leq 300$  palavras, por meio de títulos apropriados, deve fornecer o contexto ou antecedentes para a pesquisa e deve declarar sua finalidade, procedimentos básicos (seleção de sujeitos do estudo ou animais de laboratório, métodos observacionais e analíticos), principais tamanhos de efeito específicos e sua significância estatística, se possível), e principais conclusões. Deve enfatizar aspectos novos e importantes do estudo ou observações. A revista não aceita abreviaturas no resumo.

Imediatamente após o resumo, forneça no máximo seis palavras-chave em ordem alfabética e separadas por vírgulas, para representar o conteúdo do artigo. Por favor, evite usar as espécies de nomes de plantas nas palavras-chave, como já deveria estar no título e / ou no resumo. Escolha palavras representativas para ajudar a indexação e os leitores a alcançarem o seu artigo.

### **Resumo gráfico**

Um resumo gráfico é obrigatório para este periódico. Ele deve resumir o conteúdo do artigo em uma forma concisa e pictórica projetada para capturar a atenção de um grande número de leitores on-line. Os autores devem fornecer imagens que representem claramente o trabalho descrito no artigo. Os resumos gráficos devem ser enviados como um arquivo separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com um mínimo de 531 x vezes; 1328 pixels (h & w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de 5x; 13 cm usando uma resolução de tela regular de 96 dpi. Tipos de arquivos preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office.

### **O BJP não aceita resumo gráfico usando imagens de animais.**

#### ***Introdução***

Indique os objetivos do trabalho e forneça um contexto adequado, evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

#### ***Material e métodos***

Fornecer detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido. Os métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: somente modificações relevantes devem ser descritas. *Nome da planta* O nome da planta deve ser completo, incluindo nome do autor e família, de acordo com <http://www.theplantlist.org/> ou <http://www.tropicos.org>, e <http://floradobrasil.jbrj.gov.br> / 2010

/

#### ***Fórmulas Estruturais***

As estruturas químicas não são consideradas como figuras, devem ser numeradas sequencialmente em negrito, de acordo com suas citações no manuscrito, e fechadas ao ponto desejado no corpo do manuscrito. Estruturas devem ser elaboradas de acordo com o estilo estabelecido pela American Chemical Society.

Estruturas químicas de compostos bem conhecidos não serão publicadas.

#### *Abreviações*

Defina abreviações que não são padrão neste campo em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no abstrato devem ser definidas em sua primeira menção, assim como na nota de rodapé. Assegure a consistência das abreviaturas ao longo do artigo.

#### *Unidades*

Siga as regras e convenções aceitas internacionalmente: use o Sistema Internacional de Unidades (SI). Se outras unidades forem mencionadas, forneça o equivalente em SI.

#### *Fórmulas matemáticas*

Por favor, submeta equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresente fórmulas simples de acordo com o texto normal sempre que possível e use o solidus (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X / Y. Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Os poderes de e são frequentemente mais convenientemente denotados por exp. Numere consecutivamente as equações que devem ser exibidas separadamente do texto (se mencionadas explicitamente no texto).

#### *Resultados*

*Os* resultados devem ser claros e concisos.

#### *Discussão*

Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de Resultados e Discussão é frequentemente apropriada. Evite citações extensas e discussão de literatura publicada.

#### *Agradecimentos*

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como uma nota de rodapé no título ou de outra forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda no idioma, escrevendo ajuda ou revisando o artigo, etc.).

#### *Contribuições dos autores*

O papel de cada autor envolvido no desenvolvimento do estudo e / ou na elaboração do manuscrito deve ser claramente descrito, e ele / ela deve ser referido por suas iniciais.

#### *Formatação de fontes de financiamento*

Enumere as fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador: Financiamento: Este trabalho foi apoiado pelos Institutos Nacionais de Saúde [números de concessão xxxx, aaaa]; o Bill & amp; Fundação Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; e os Institutos de Paz dos Estados Unidos [grant number aaaa]. Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de subsídios e prêmios. Quando o financiamento for proveniente de uma bolsa em bloco ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento. Se nenhum financiamento tiver sido fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase: Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

### **Obra de arte**

*A revista utiliza papel reciclado, portanto, os valores de cores são aceitos e estarão disponíveis apenas na versão online.*

### **Manipulação de imagens**

Embora seja aceito que os autores às vezes precisam manipular imagens para maior clareza, a manipulação para fins de fraude ou fraude será vista como abuso ético científico e será tratada de acordo. Para imagens gráficas, esta revista está aplicando a seguinte política: nenhum recurso específico dentro de uma imagem pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido. Ajustes de brilho, contraste ou balanço de cores são aceitáveis se e desde que não obscurecem ou eliminam qualquer informação presente no original. Ajustes não-lineares (*por exemplo*, mudanças nas configurações gama) devem ser divulgados na legenda da figura.

### **Arte eletrônica**

#### *Pontos*

*gerais*

- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes de sua arte original.
- Fontes preferidas: Arial (ou Helvetica), Times New Roman (ou Times), Símbolo, Courier.
- Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de ilustrações.
- Indique por figura se é uma imagem de ajuste única, de 1,5 ou de 2 colunas.
- Somente para envios de palavras, você ainda pode fornecer figuras e suas legendas e tabelas em um único arquivo no estágio de revisão.
- Observe que os arquivos de figuras individuais maiores que 10 MB devem ser fornecidos em arquivos de origem separados.

#### *Formatos*

, independentemente da aplicação utilizada, quando o seu trabalho artístico eletrônico é finalizado, por favor 'salvar como' ou converter as imagens para um dos seguintes formatos (observe os

requisitos de resolução para desenhos de linha, meios-tons e combinações de linha / meio-tons abaixo indicados):

EPS (ou PDF): desenhos vetoriais. Incorporar a fonte ou salvar o texto como 'gráficos'.

TIFF (ou JPG): Fotografias coloridas ou em tons de cinza (meios-tons): use sempre um mínimo de 300 dpi.

TIFF (ou JPG): Desenhos de linha de bitmap: use no mínimo 1.000 dpi.

TIFF (ou JPG): combina linhas / tons de bitmap (cores ou tons de cinza): é necessário um mínimo de 500 dpi.

**Por favor, não:**

- Fornecer arquivos que são otimizados para uso de tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); a resolução é muito baixa.
- Forneça arquivos com resolução muito baixa.
- Envie gráficos que são desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

### ***Trabalho artístico colorido***

Certifique-se de que os arquivos de trabalho artístico estejam em um formato aceitável (arquivos TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF) ou MS Office) e com a resolução correta. Se, junto com o artigo aceito, você enviar figuras utilizáveis em cores, a revista garantirá, sem custos adicionais, que esses números aparecerão em cores on-line (por exemplo, ScienceDirect e outros sites) independentemente de essas ilustrações estarem ou não reproduzidas. cor na versão impressa.

### ***Legendas das figuras***

Assegure-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Uma legenda deve conter um breve título (**não** na própria figura) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas próprias ilustrações no mínimo, mas explique todos os símbolos e abreviações usadas.

### **Tabelas**

Por favor, envie tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em páginas separadas no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque quaisquer notas de tabela abaixo do corpo da tabela. Seja poupado no uso de tabelas e garanta que os dados apresentados neles não dupliquem os resultados descritos em outra parte do artigo. Por favor, evite usar regras verticais.

### **Referência**

#### ***Citação no texto***

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estejam presentes na lista de referências (e vice-versa). Quaisquer referências citadas no resumo devem ser dadas na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências forem incluídas na lista de

referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e incluir uma substituição da data de publicação por "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". A citação de uma referência como 'in press' implica que o item foi aceito para publicação.

### ***Links de referência***

A maior capacidade de descoberta de pesquisas e a revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por links on-line para as fontes citadas. Para nos permitir criar links para serviços de abstração e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, assegure-se de que os dados fornecidos nas referências estejam corretos. Por favor, note que sobrenomes incorretos, títulos de periódicos / livros, ano de publicação e paginação podem impedir a criação de links. Ao copiar referências, tenha cuidado, pois elas já podem conter erros. O uso do DOI é incentivado. Um DOI pode ser usado para citar e vincular a artigos eletrônicos onde um artigo é in-press e detalhes completos de citação ainda não são conhecidos, mas o artigo está disponível online. Um DOI é garantido para nunca mudar, então você pode usá-lo como um link permanente para qualquer artigo eletrônico. Um exemplo de uma citação usando o DOI para um artigo ainda não publicado é: VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeh WB, Franke M., 2003. Aseismic continuação da laje Lesser Antilles abaixo do nordeste da Venezuela. *J. Geophys. Res.* <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Por favor, note que o formato de tais citações deve estar no mesmo estilo de todas as outras referências no artigo.

### ***Referências da Web***

No mínimo, a URL completa deve ser fornecida e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser fornecida.

### ***Referências de dados***

Esta revista encoraja-o a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes no seu manuscrito, citando-os no seu texto e incluindo uma referência de dados na sua Lista de Referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador global persistente. Adicione o [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo corretamente como uma referência de dados. Este identificador não aparecerá em seu artigo publicado.

### ***Referências em uma edição especial***

Assegure-se de que as palavras "esta questão" sejam adicionadas a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) a outros artigos na mesma Edição Especial. Autor em caixa baixa, seguido do ano de publicação entre parênteses, *por ex.* Pereira (1999); no final da citação: Autor em minúsculas e ano, ambos entre parênteses. *por exemplo.* (Silva, 1999) ou

(Silva e Souza, 1998) ou (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a, b); citação textual: a página deve ser fornecida, *por exemplo*. (Silva, 1999, p. 24).

### **Material suplementar**

Material suplementar pode apoiar e aprimorar sua pesquisa científica. Arquivos suplementares oferecem ao autor possibilidades adicionais de publicar aplicativos de suporte, imagens de alta resolução, conjuntos de dados de segundo plano, clipes de som e muito mais. Por favor, note que esses itens são publicados on-line exatamente como eles são submetidos; não há digitação envolvida (dados suplementares fornecidos como um arquivo do Excel ou como um slide do PowerPoint aparecerá como tal online). Envie o material juntamente com o artigo e forneça uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo. Se você deseja fazer alterações nos dados suplementares durante qualquer etapa do processo, forneça um arquivo atualizado e não anote as correções de uma versão anterior. Por favor, também certifique-se de desligar o 'Track Changes'

### **Dados da pesquisa**

Esta revista encoraja e permite que você compartilhe dados que suportam sua publicação de pesquisa quando apropriado, e permite interligar os dados com seus artigos publicados. Os dados da pesquisa referem-se aos resultados das observações ou experimentações que validam os resultados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e reutilização de dados, este periódico também incentiva você a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados ao projeto.

Abaixo estão algumas maneiras pelas quais você pode associar dados ao seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu manuscrito. Se você está compartilhando dados de uma destas maneiras, é encorajado a citar os dados em seu manuscrito e lista de referências. Por favor, consulte a seção "Referências" para mais informações sobre a citação de dados.

### **Depois da aceitação**

#### **Disponibilidade do artigo aceito**

Esta revista disponibiliza artigos on-line o mais rápido possível após a aceitação. Isso se refere ao artigo aceito (em formato HTML e PDF), que ainda não foi copiado, formatado ou revisado. Um identificador de objeto digital (DOI) é alocado, tornando-o totalmente citável e pesquisável por título, nome do autor (s) e o texto completo. O PDF do artigo também traz um aviso afirmando que é um artigo não editado. Os estágios de produção subsequentes simplesmente substituirão esta versão.

### **Provas**

Um conjunto de provas de página (como arquivos PDF) será enviado por e-mail para o autor correspondente ou, um link será fornecido no e-mail para que os autores possam baixar os próprios

arquivos. A revista fornece aos autores provas em PDF que podem ser anotadas; Para isso, você precisará baixar o Adobe Reader gratuito. Instruções sobre como anotar arquivos PDF acompanharão as provas (também fornecidas on-line). Os requisitos exatos do sistema são fornecidos no site da Adobe. Se você não quiser usar a função de anotações em PDF, poderá listar as correções (incluindo respostas ao Formulário de Consulta) e devolvê-las pelo sistema. Por favor, use esta prova apenas para verificar a composição, edição, integralidade e exatidão do texto, tabelas e figuras. Alterações significativas no artigo aceito para publicação somente serão consideradas nesta fase com a permissão do Editor. Faremos todo o possível para publicar o seu artigo com rapidez e precisão. É importante assegurar que todas as correções sejam enviadas de volta para nós em uma comunicação: por favor, verifique cuidadosamente antes de responder, pois a inclusão de quaisquer correções subsequentes não pode ser garantida. A revisão é da sua exclusiva responsabilidade.

### **Consultas a Autores**

Você pode verificar o status do seu artigo enviado ou descobrir quando seu artigo aceito será publicado .

Setembro de 2017.