

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*:
DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE

CAROLINE MARIA IGREJAS LOPES

RECIFE

2015

CAROLINE MARIA IGREJAS LOPES

ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*:
DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liriane Baratella Evêncio

Co-orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

RECIFE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L864e Lopes, Caroline Maria Igrejas.
Estudo de bioprospecção de *Avicennia schaueriana*: desenvolvimento
de um creme cicatrizante /. – Recife: O Autor, 2015.
72 f.: il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientadora: Liriane Baratella Evêncio.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Avicennia. 2. Cromatografia em camada delgada. 3. Células vero.
4. Cicatrização. 5. Reepitelização. I. Evêncio, Liriane Baratella
(Orientadora). II.
Titulo.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2015-199)

TÍTULO DO TRABALHO: ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *AVICENNIA*
SCHAUERIANA: DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE

NOME DO ALUNO: CAROLINE MARIA IGREJAS LOPES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10 DE AGOSTO DE 2015

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual: _____

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza: _____

Profa. Dra. Andrea dos Anjos Pontual: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli

Prof. Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

MEMBRO COLABORADOR

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA : Oziclere Sena de Araújo

*Dedico este trabalho a Deus por todas as graças
alcançadas e aos meus familiares por me ajudarem a
tornar esse sonho realidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela sabedoria e força para concretização deste sonho. Agradeço imensamente pelas graças alcançadas ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Aurea e Leonardo, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem para seguir firme e determinada nos meus ideais, por terem contribuído para a construção do meu caráter e pelo amor e dedicação dados durante todo esse tempo. Não existem palavras para expressar a minha gratidão.

Aos meus irmãos, Danielle e Leonardo, pelo apoio, carinho, compreensão e amizade.

À minha avó, Mariza, por sempre estar rezando para a minha felicidade, por me apoiar e acreditar no meu potencial.

Ao meu noivo, Bernardo, por todo amor, paciência, apoio, compreensão e que, mesmo distante, me ajudou e me aconselhou bastante durante os momentos de estresse. Você foi essencial nessa conquista, muito obrigada.

À minha querida Tia Lou, que sempre me chamava para sair e quase nunca eu podia ir, porque tinha que dar continuidade a minha pesquisa. Muito obrigada pela compreensão, carinho, incentivo e amor a mim dedicados.

À minha futura sogra, Márcia e minha tia do coração, tia Rosa, agradeço bastante por todos os momentos especiais que vocês me proporcionaram, pela compreensão, incentivo e apoio.

A todos os meus amigos, principalmente, Ary, Aninha, Lila, Nathy, Babi, Gabi, Henrique, Rafa, Ju e meus familiares que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando a perseverar e a seguir firme nessa caminhada.

Às meninas do pilates, Dani, Gabi, Priscila e Suzana por me escutarem e pelos conselhos dados, sempre me incentivando a seguir em frente.

Aos meus amigos de mestrado, especialmente, Fernandinha, Dani, Rafa e Anderson que se tornaram verdadeiros amigos. Obrigada por dividirem comigo momentos de angústias e alegrias. Foi muito bom contar com vocês!

À Universidade Federal de Pernambuco, o Biotério do Departamento de Antibióticos CCB/UFPE, o Departamento de Histologia e Embriologia do CCB/UFPE e o Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica/CCB/UFPE, por permitirem que eu realizasse esse sonho de conclusão do mestrado, pois possuíam pessoas bem preparadas, equipamentos e materiais que viabilizaram o desenvolvimento do projeto.

A todos os professores do programa de pós-graduação em odontologia, pela atenção dada e pelas aulas ministradas, que foram muito úteis para a concretização deste projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante esses 2 anos de mestrado.

Às professoras Sara Grinfield e Viviane Colares, que me acolheram carinhosamente no estágio docência e me fizeram aprender mais durante as aulas e na clínica de adolescentes.

Ao professor Danyel Perez, por toda disponibilidade e ajuda para o escaneamento das lâminas histológicas, que foi de extrema importância para a finalização desta pesquisa.

À professora Ivone e a todas as pessoas que me ajudaram na realização dessa pesquisa, especialmente, Erwelly, Jeferson, Marllon, Pedro, Layse, Isaú, Alessandra, Jéssica e Mariana. Agradeço carinhosamente a todos vocês, cada um foi extremamente importante para a concretização deste sonho, pois sem vocês não seria possível à realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Liriane Baratella e meu co-orientador Jeymesson Vieira, pela exemplar orientação, paciência, pela sinceridade, atenção e por todo o esforço e seriedade durante a orientação e correção deste trabalho, ajudando-me a conquistar mais essa etapa da minha vida. Vocês foram peças fundamentais para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Introdução: *Avicennia schaueriana* é uma espécie endêmica da vegetação de manguezal pertencente à família Verbenaceae. As espécies do gênero *Avicennia* são muito utilizadas pelas comunidades tradicionais para cura de várias doenças. **Objetivo:** Investigar a presença de compostos químicos e avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana* e a ação cicatrizante do creme desse extrato nas feridas cutâneas em ratos. **Materiais e Métodos:** O extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* foi analisado por cromatografia em camada delgada para realização do perfil fitoquímico de cumarinas, flavonoides, triterpenos e taninos. Para a análise de saponinas foi utilizado o teste de formação de espuma e para os alcaloides o de precipitação. A avaliação citotóxica foi realizada através do método colorimétrico de brometo em células Vero. A ação cicatrizante foi avaliada utilizando 45 ratos divididos em três grupos iguais tratados durante 5, 10 e 15 dias com creme de extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana*, solução de cloreto de sódio a 0,9% e creme de dexpanthenol, aplicados sobre a região dorsal previamente tricotomizada e lesionada. Foram realizadas mensurações iniciais e finais de cada ferida para calcular o índice de cicatrização das úlceras, a análise histomorfométrica e a contagem dos fibroblastos nas secções histológicas das feridas cirúrgicas nos diferentes grupos e intervalos de tempo. **Resultados:** O estudo fitoquímico mostrou a presença de flavonoides, taninos, triterpenos e saponinas, porém não foi evidenciada a presença de cumarinas e alcaloides. Em relação à citotoxicidade *in vitro*, observou-se que o extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* não foi considerado citotóxico, pois apresentou capacidade de proliferação de células Vero na maior concentração testada (100µg/mL). Na análise morfológica verificou-se que o percentual médio de contração das feridas, após 10 dias de tratamento, foi mais elevado no grupo medicado com dexpanthenol (93,41%). No tempo de 15 dias, o menor percentual médio de contração ocorreu no grupo do dexpanthenol (94,41%) e o maior no de *A. schaueriana* (98,50%). Na histomorfometria, após 10 dias da cirurgia, o grupo do dexpanthenol apresentou o menor comprimento médio não reepitelizado, não demonstrando diferença significativa com o de *A. schaueriana*, mas apresentando com o soro fisiológico. No período de 15 dias, a média foi nula no grupo da planta estudada, indicando 100% de reepitelização das feridas. Evidenciou-se também que, após 10 dias, o número médio de fibroblastos encontrado no grupo *A. schaueriana* foi mais elevado do que o soro fisiológico. No período de 15 dias, o grupo *A. schaueriana* manteve uma maior quantidade de fibroblastos quando comparado aos demais grupos. **Conclusão:** O extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* contém importantes

metabólitos secundários, associados a relevantes propriedades farmacológicas. Além disso, a espécie *A. schaueriana* não apresenta atividade citotóxica e a aplicação tópica do creme desse extrato diminui a área da ferida, estimula a reepitelização e aumenta o número de fibroblastos, exibindo ação cicatrizante mais eficiente nas feridas cutâneas em ratos do que o creme de dexpanthenol. Portanto, esta planta poderá tornar-se um tratamento de uso tópico no processo de reparação tecidual.

Palavras-chaves: Avicennia. Cromatografia em Camada Delgada. Células Vero. Cicatrização. Reepitelização.

ABSTRACT

Introduction: *Avicennia schaueriana* is an endemic species of mangrove vegetation belonging to the Verbenaceae family. The species of the *Avicennia* gender are extensively used by traditional communities for curing various diseases. **Aim:** To investigate the presence of chemical compounds and to evaluate the cytotoxicity *in vitro* of aqueous extract of *Avicennia schaueriana* leaves and the healing action of the cream of this extract in skin wounds in mice. **Materials and Methods:** The aqueous extract of *A. schaueriana* leaves was analyzed by thin-layer chromatography for performing the phytochemical profile of coumarins, flavonoids, triterpenes and tannins. For the analyses of saponins the formation of foaming test was used and alkaloids the precipitation. The cytotoxic evaluation was performed using the colorimetric method of bromide in Vero cells. The cicatrizing activity was evaluated using 45 mice, divided into three equal groups treated for 5, 10 and 15 days with the cream of the aqueous extract of *A. schaueriana* leaves, solution of sodium chloride at 0.9% and cream of dexpanthenol, applied to the dorsal region previously shaved and injured. Thus, the initial and final measurements of each wound were taken to calculate the rate of healing of the ulcers, the histomorphometric analysis and the count of fibroblasts of histological sections of surgical wounds in the different groups and timeslots. **Results:** The phytochemical study showed the presence of flavonoids, tannins, triterpenes and saponins, but the presence of coumarins and alkaloids was not detected. Regarding the cytotoxicity *in vitro*, it was observed the aqueous extract of *A. schaueriana* leaves was not considered cytotoxic, as it presented Vero cell proliferation capacity at the highest concentration tested (100µg/ml). In the morphometric analysis, it was found that the average percentage of contraction of the wounds, after 10 days of treatment, was higher in the group medicated with dexpanthenol (93.41%). In the 15 days analysis, the lowest average percentage of contraction was observed in the dexpanthenol group (94.41%) and the highest in the *A. schaueriana* (98.50%). In the histomorphometry, after 10 days of the surgery, the dexpanthenol group had the lowest average length not re-epithelialized, showing no significant statistical difference from the *A. schaueriana*, but showing with saline solution. In the 15-days period, the average was void in the group of the studied plant, indicating 100% of re-epithelialization of the wounds. It was also noticed that after 10 days, the average number of fibroblasts found in the *A. schaueriana* group was higher than the saline solution. In the 15-days period, the *A. schaueriana* group maintained a higher amount of fibroblasts when compared to the others groups. **Conclusion:** The aqueous extract of *A. schaueriana* leaves contains important secondary metabolites,

which have relevant pharmacological properties. Furthermore, the species *A. schaueriana* present no cytotoxic activity and the topical application of the cream of this extract decreases the wound area, stimulates the re-epithelialization, and increases the number of fibroblasts, presenting healing action more efficient, on mice skin wounds, than dexpanthenol cream. Therefore, this plant could become a topical treatment in the tissue repair process.

Key-words: Avicennia. Thin-Layer Chromatography. Vero Cells. Wound Healing. Re-Epithelialization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO CIENTÍFICO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*

Figura 1. Resultados da cromatografia em camada delgada com Extrato Aquoso (EA) de folhas de *A. schaueriana* e Padrão (P).....20

Quadro 1 – Metabólitos, padrões, reveladores, fase móvel e a proporção da fase móvel utilizados para o *Screening* Fitoquímico do extrato aquoso de *A. schaueriana*..... 19

Quadro 2 – Prospecção dos constituintes da planta..... 19

ARTIGO CIENTÍFICO 2: ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*: DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE

Figura 1. Processo de cicatrização das feridas em diferentes dias e tratamentos 38

Figura 2. Secções histológicas de pele dorsal de ratos mostrando grupo controle (A), tratado com dexpanthenol (B) e medicado com *A. schaueriana* (C). Todas as imagens mostram o grau de reepitelização após 15 dias de tratamento: [1] distância entre os epitélios e [2] reepitelização total. Coloração HE. Aumento 2x.42

Quadro 1 – Descrição do aspecto macroscópico das feridas induzidas na região dorsal dos ratos no intervalo de 5, 10 e 15 dias.39

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO 2: ESTUDO DE BIOPROSPEÇÃO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*: DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE

Tabela 1 – Medidas do número de células Vero em concentrações decrescentes de <i>Avicennia schaueriana</i> e em DMEM e PBS.	37
Tabela 2 – Medidas da área da ferida (mm ²) e o percentual de contração da ferida de acordo com o grupo e o tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico <i>in vivo</i>	40
Tabela 3 – Distância entre os epitélios da ferida cirúrgica dos grupos em relação ao tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico <i>in vivo</i>	41
Tabela 4 – Medidas da contagem de fibroblastos dos grupos em relação ao tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico <i>in vivo</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
A.	<i>Avicennia</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
cm	Centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbeco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETOH	Etanol
g	Grama
h	Hora
M	Mol
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
nm	Nanômetro
nº	Número
°C	grau centígrado
PBS	solução de tampão fosfato salino
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1.APRESENTAÇÃO	12
2.OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. ARTIGO CIENTÍFICO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE AVICENNIA SCHAUERIANA.....	14
1.RESUMO.....	14
2.ABSTRACT	15
3.INTRODUÇÃO.....	15
4.MATERIAS E MÉTODOS	17
4.1.Material vegetal	17
4.2.Obtenção do extrato aquoso de <i>Avicennia schaueriana</i>	18
4.3.Estudo Fitoquímico.....	18
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6.CONCLUSÃO.....	22
7.DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE	22
8.REFERÊNCIAS	23
4. ARTIGO CIENTÍFICO 2: ESTUDO DE BIOPROSPEÇÃO DE AVICENNIA SCHAUERIANA: DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE	27
1.RESUMO.....	27
2.ABSTRACT	28
3. INTRODUÇÃO	30
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	32
4.1. <i>Material vegetal</i>	32
4.2. <i>Material biológico</i>	32
4.2.1. <i>Obtenção do extrato aquoso de folhas de Avicennia schaueriana</i>	32
4.2.2. <i>Cultura celular</i>	33
4.2.3. <i>Confecção do creme de Avicennia schaueriana</i>	33
4.2.4. <i>Animais experimentais</i>	33
4.3. <i>Teste de citotoxicidade</i>	34

4.4. Ação cicatrizante	34
4.4.1. Divisão dos grupos	34
4.4.2. Procedimentos cirúrgicos em tecidos lesados in vivo	35
4.4.3. Pós-operatório das feridas cutâneas	35
4.4.4. Análise morfológica da ferida	36
4.4.5. Estudo histomorfométrico.....	36
4.5. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Citotoxicidade.....	37
5.2. Descrição macroscópica das feridas.....	38
5.3. Análise morfológica das feridas.....	39
5.4. Análise Histomorfométrica e contagem dos fibroblastos.....	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO 1	51
ANEXO 2	56
ANEXO 3	57

1. APRESENTAÇÃO

A presente dissertação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) faz parte de um projeto intitulado: Atividades Biológicas de Plantas do Mangue Brasileiro iniciado no Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

Após a realização de um estudo piloto sobre o efeito tóxico de extratos de plantas do mangue em células e larvas, verificou-se, de forma contrária, o estímulo à proliferação celular. Diante de tal fato, este estudo se propôs a investigar a presença de compostos químicos e avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana* e a ação cicatrizante nas feridas cutâneas em ratos através da formulação de um creme desse extrato. Este trabalho incentivou a busca pela concessão de uma patente para fins de bioprospecção.

Os dados obtidos com este estudo resultaram em dois artigos originais intitulados: “Estudo fitoquímico preliminar do extrato aquoso de *Avicennia schaueriana*”, o qual será enviado para o International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences; e “Estudo de bioprospecção de *Avicennia schaueriana*: desenvolvimento de um creme cicatrizante”, que será enviado para o Journal of Ethnopharmacology.

Atendendo as normas vigentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia para elaboração da dissertação, os dados obtidos nesta pesquisa estão apresentados no formato de artigos originais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar os compostos químicos e realizar a bioprospecção de um creme cicatrizante a partir do extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana*.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar a presença de alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos, saponinas e taninos em extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* sobre células Vero;
- Avaliar a evolução clínica do reparo das feridas cutâneas e realizar a análise morfométrica dessas lesões na região dorsal de ratos *wistar*;
- Analisar histomorfometricamente a reepitelização e a contagem dos fibroblastos nas secções histológicas das feridas cutâneas da região dorsal de ratos *wistar*.

3. ARTIGO CIENTÍFICO 1

ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*

CAROLINE MARIA IGREJAS LOPES¹, JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA², JÉSSICA GUIDO DE ARAÚJO², MARLLON ALEX NASCIMENTO SANTANA², PEDRO PAULO MARCELINO NETO², MARIANA OLIVEIRA BARBOSA³, LIRIANE BARATELLA-EVÊNCIO².

¹Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil, ²Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, ³Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Telefone: +5581 21268535, Fax: +5581 21268560

Email: carol_igrejas@hotmail.com

1. RESUMO

Avicennia schaueriana é uma espécie endêmica da vegetação de manguezal pertencente à família Verbenaceae. As espécies do gênero *Avicennia* são muito utilizadas pelas comunidades tradicionais para cura de várias doenças. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de compostos químicos em extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana*. Esse extrato foi submetido à filtração simples e, posteriormente, analisado por cromatografia em camada delgada para realização do perfil fitoquímico de cumarinas, flavonoides, triterpenos e taninos. Para a análise de saponinas foi utilizado o teste de formação de espuma e para os alcaloides o teste de precipitação. O estudo fitoquímico mostrou a presença de flavonoides, taninos, triterpenos e saponinas, porém não foi evidenciada a presença de cumarinas e alcaloides. Assim, foi possível concluir que o extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana* contém importantes metabólitos secundários, associados a relevantes propriedades farmacológicas.

Palavras-chaves: *Avicennia*, Cromatografia em Camada Delgada, Plantas Medicinais.

2. ABSTRACT

Avicennia schaueriana is an endemic species of mangrove vegetation belonging to the Verbenaceae family. The species of the *Avicennia* gender are extensively used by traditional communities for curing various diseases. The aim of the study was to investigate the presence of chemical compounds in aqueous extract of *Avicennia schaueriana* leaves. The aqueous extract of *A. schaueriana* leaves was subjected to simple filtration and then analyzed by thin-layer chromatography for performing the phytochemical profile of coumarins, flavonoids, triterpenes and tannins. For the analyses of saponins the formation of foaming test was used and alkaloids the precipitation test. The phytochemical study showed the presence of flavonoids, tannins, triterpenes and saponins, but the presence of coumarins and alkaloids was not detected. Thus, it was concluded the aqueous extract of *A. schaueriana* leaves contains important secondary metabolites, which have relevant pharmacological properties.

Key-words: *Avicennia*, Thin-Layer Chromatography, Medicinal plants.

3. INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior parte da população do mundo usa plantas na forma de medicamentos [1], mas a utilização de recursos naturais no tratamento e cura de doenças existe desde os primórdios da civilização [2]. As plantas mostram-se importantes no descobrimento de novos fármacos, pois fornecem princípios ativos para a síntese de novos medicamentos, os quais são baseados em modelos químicos oriundos de compostos secundários das plantas [1].

Em relação à magnitude da biodiversidade brasileira, não é conhecida com precisão em decorrência da sua complexidade, estimando-se mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos. Isso coloca o Brasil como detentor da maior diversidade biológica do mundo [3], apresentando um grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia. Contudo, apesar de toda a diversidade de espécies existentes, o potencial de uso de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado. Entre as 250 mil e 500 mil espécies de plantas estimadas no mundo, apenas pequena percentagem tem sido investigada fitoquimicamente, fato que ocorre também em relação às propriedades farmacológicas, nas quais, em muitos casos, existem apenas estudos preliminares [4]. Em relação ao uso médico, estima-se que apenas 5 mil espécies foram

estudadas [5]. No Brasil, com cerca de 55 mil espécies de plantas, há relatos de investigação de apenas 0,4% da flora [6].

Cumprе ressaltar que cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais para tratar certas doenças, visto que elas são conhecidas como uma importante fonte de substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos [4]. Entretanto, várias comunidades têm utilizado plantas cujos efeitos não foram analisados, o que pode representar sérios riscos a saúde [7]. Isso acontece porque os produtos fitoterápicos são, algumas vezes, erroneamente considerados como seguros porque são de origem natural [8]. Porém, esses produtos contêm princípios bioativos capazes de causar efeitos adversos [9]. Por isso, estudos acerca das propriedades farmacológicas de diversas plantas têm se intensificado a fim de minimizar esses riscos, bem como buscar novas drogas eficazes para o combate de doenças [7].

Os manguezais podem apresentar plantas medicinais e extratos de diferentes partes delas são amplamente utilizados ao redor do mundo [10]. Esse tipo de vegetação apresenta uma rica fonte de triterpenos, saponinas, taninos, alcaloides e flavonoides [11,12,13]. Extratos dessas plantas demonstraram, em estudos anteriores, atividades antiviral, antibacteriana e antifúngica [10,12].

Foram descritas diversas atividades para as classes de substâncias contendo flavonoides como ações hipoglicemiante, antioxidante, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral [14,15,16,17]. As cumarinas apresentam atividades antifúngica, inseticida, vasodilatadora coronariana e anticoagulante [18]. Além disso, possuem efeito anti-inflamatório que pode ser devido à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias no local de inflamação [19]. Os alcaloides são antitumorais, antitussígenos e antivirais [20]. Os triterpenoides também apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais se destacam: cardioprotetora [21], gastroprotetora [22], anti-inflamatória [23], antitumoral [24] e anti-hiperglicêmica [25]. Já os taninos ajudam no tratamento da hipertensão arterial, além de apresentarem propriedades bactericidas e fungicidas [20] como também possuem efeito cicatrizante de feridas e úlceras [26,27]. Por último, as saponinas têm atividade antiviral, atuam sobre as membranas celulares [20], como também possuem ações antiulcerogênica e sedativa [28]. Flavonoides [29], taninos [30] e saponinas [31] são conhecidos por promoverem o processo de cicatrização de feridas, principalmente devido as suas propriedades adstringente e antimicrobiana, que parecem ser responsáveis pela contração da ferida e aumento da taxa de epitelização [32].

As florestas de mangue do litoral brasileiro são compostas basicamente por três gêneros: *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora*, podendo existir ainda representantes do gênero *Conocarpus* [33]. O gênero *Avicennia*, com a ocorrência de duas espécies no Brasil, *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans* [34], é bem adaptado para sobreviver em substrato periodicamente inundado por águas salobras [35]. A *Avicennia schaueriana* conhecida popularmente como mangue-preto ou siriúba, é uma espécie endêmica da vegetação de manguezal pertencente à família Verbenaceae. É uma planta arbórea de médio porte com casca lisa castanho-claro, possui folhas esbranquiçadas na face abaxial devido à presença de minúsculas escamas [36].

É crescente a gama de estudos que investigam o potencial terapêutico de plantas medicinais, normalmente, empregadas pelas comunidades tradicionais, mas que não tiveram ainda sua eficácia cientificamente comprovada. Os compostos destas plantas têm sido objeto de interesse para o tratamento de vários tipos de infecções humanas. Ressalta-se que é necessária a realização de tais investigações, pois a seleção de plantas a partir de informações da medicina tradicional ou popular pode conduzir a descoberta de moléculas promissoras [37,38].

Dessa forma, para a realização do *screening* fitoquímico de determinada espécie vegetal, a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma das técnicas mais empregadas devido à simplicidade, rapidez, praticidade e baixo custo [39]. Consiste em um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária [40]. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar a presença de compostos químicos, especialmente alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos, saponinas e taninos, em extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana*, com a finalidade de aprofundar os conhecimentos relativos às propriedades farmacológicas desta planta.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

As folhas da espécie *Avicennia schaueriana* foram coletadas em outubro de 2013, no mangue da Ilha de Itamaracá, situado em Vila Velha, no litoral norte do Estado de Pernambuco, Brasil, entre as coordenadas 07°48.716' latitude sul e 34°51.347' longitude oeste. Uma exsicata do material botânico encontra-se depositada no acervo do Herbário

Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o número de registro UFP 75.458.

4.2. Obtenção do extrato aquoso de *Avicennia schaueriana*

O extrato aquoso foi preparado por infusão a partir de 226g de folhas frescas de *Avicennia schaueriana*. O material foi pesado, triturado e extraído com água destilada a 40°C por 20 minutos; o resíduo sólido foi removido por filtração e a água por liofilização. Por sua vez, o material seco foi estocado à -20°C. O rendimento do extrato aquoso foi de 4%, sendo utilizado para a realização do estudo fitoquímico.

4.3. Estudo Fitoquímico

Para a realização do estudo fitoquímico de cumarinas, flavonoides, triterpenos e taninos, foi aplicada uma amostra do extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* com o auxílio de um tubo capilar [20] no lado esquerdo de uma placa cromatográfica constituída de gel de sílica com dimensões 20 cm x 20 cm e 0,25 mm de espessura (fase estacionária da CCD) (Merck - Darmstadt, Alemanha). O padrão correspondente a cada classe de metabólito foi depositado no lado direito da placa cromatográfica. Ambos, extrato e padrão, foram aplicados a um centímetro da base da placa e o líquido foi transferido por capilaridade para a superfície da fase estacionária, penetrando-a [20].

A cromatografia foi obtida por uma técnica de ascensão, na qual a placa cromatográfica foi colocada imersa no solvente de desenvolvimento adequado (fase móvel), até uma profundidade aproximada de 0,5 cm da base da placa, em uma cuba cromatográfica. Dessa forma, a cromatografia se desenvolveu com a fase móvel migrando através da fase estacionária por ação da capilaridade [20].

Após esse processo, as placas foram retiradas da cuba cromatográfica e levadas para secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, foram empregados os reveladores adequados para obtenção dos resultados quanto à presença ou ausência dos constituintes químicos investigados. O quadro 1 mostra os padrões cromatográficos, os diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados para cada classe de metabólito.

Quadro 1 – Metabólitos, padrões, reveladores, fase móvel e a proporção da fase móvel utilizados para o *screening* Fitoquímico do extrato aquoso de *A. schaueriana* [20,41].

METABÓLITOS	PADRÕES	REVELADORES	FASE MÓVEL	PROPORÇÃO
Cumarinas	Ácido cumárico	KOH 10 % – ETOH	Tolueno + Éter	50:50
Flavonóides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Ácido Acético glacial + Água	100:11:11:26
Triterpenos	Lupeol	Lieberman – Burchard	Tolueno + Clorofórmio + Etanol	40:40:10
Taninos	Ácido Tânico	Cloreto férrico 1%	Clorofórmio + Metanol + Água	65:30:5

Em relação à prospecção de constituintes da planta, no que diz respeito à presença ou ausência de um determinado constituinte químico na espécie vegetal, a leitura da placa cromatográfica foi realizada seguindo os critérios de colorações especificados no quadro 2.

Quadro 2 – Prospecção dos constituintes da planta [42, 43].

Constituinte químico	Coloração
Triterpenos	Azul-esverdeada
Flavonoides	Parda a vermelha
Taninos	Verde ou azulada
Cumarinas	Amarela esverdeada

A identificação de triterpenos, flavonoides e cumarinas foi realizada em presença de luz ultravioleta.

O teste de alcaloides foi realizado segundo Honda et al. [42], com modificações. Dessa forma, cinco gotas do extrato aquoso foram colocadas em um vidro de relógio e acidificadas com três gotas de ácido clorídrico a 1%. Posteriormente, foram acrescentadas três gotas do reagente Dragendoff. A formação de precipitados insolúveis indica a presença de alcaloides na espécie vegetal.

Por fim, para verificar a presença de saponinas na *A. schaueriana*, foram utilizados 2 mL do extrato aquoso da planta, misturados com 2 mL de clorofórmio e 5 mL de água

destilada. A solução foi filtrada para um tubo de ensaio e agitada por 3 minutos de forma ininterrupta. Após a agitação, caso as saponinas estiverem presentes na espécie vegetal, existirá espuma persistente e abundante, formando uma espécie de colarinho na solução contida no tubo de ensaio [20,42].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados do estudo fitoquímico do extrato aquoso da espécie vegetal *Avicennia schaueriana*. Observou-se a presença de taninos, saponinas, flavonoides e triterpenos, porém não foi evidenciada a presença de cumarinas e alcaloides.

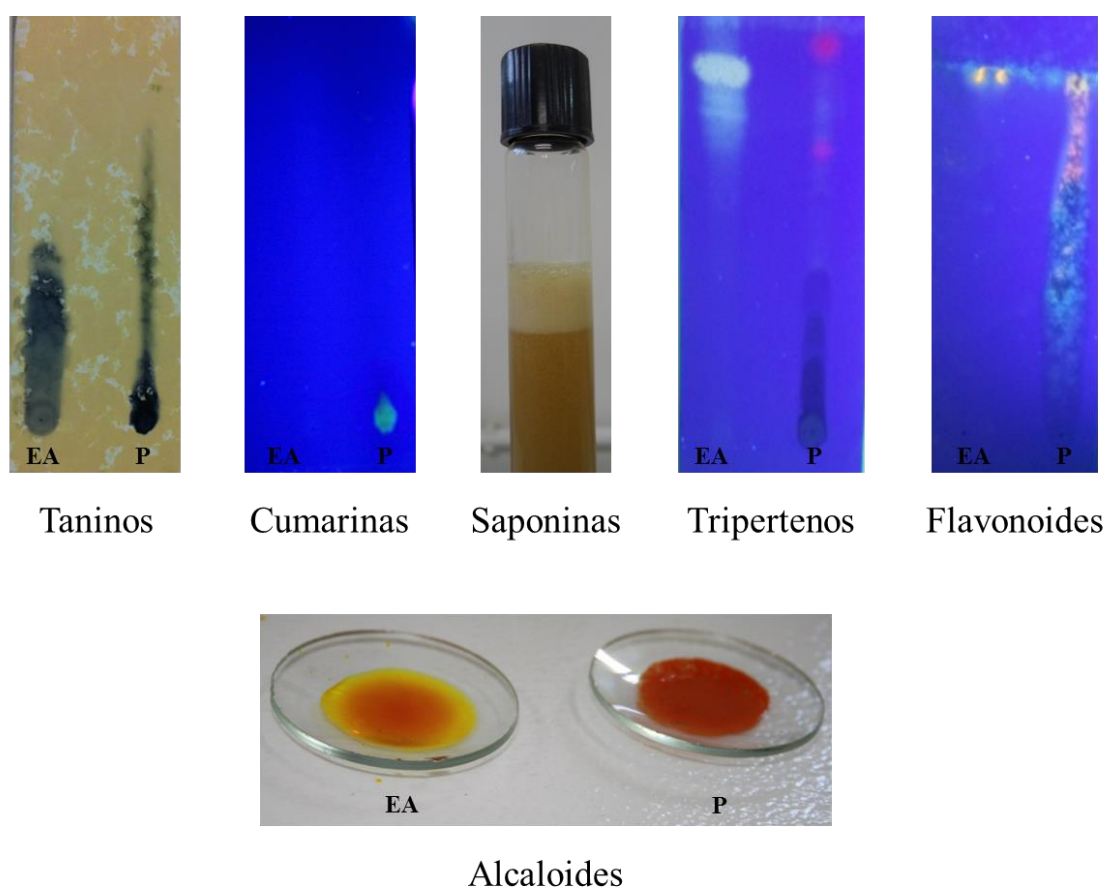


Figura 1. Resultados do estudo fitoquímico do Extrato Aquoso (EA) de folhas de *A. schaueriana* e Padrão (P)

Estudos fitoquímicos são ferramentas importantes para detectar compostos com propriedades farmacológicas em extratos brutos de plantas medicinais. Pesquisas sobre *screening* fitoquímico são comuns na literatura e mostram-se importantes para o

conhecimento de novas substâncias com potencial terapêutico. Contudo, não foram encontrados artigos publicados abordando o *screening* do extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* no que diz respeito à presença ou ausência de metabólitos secundários. Mas, foram identificados estudos que avaliaram o perfil fitoquímico de outras espécies da família Verbenaceae fornecendo subsídios para um estudo comparativo entre elas.

Observou-se na triagem fitoquímica de *A. schaueriana* a identificação de flavonoides, triterpenos, saponinas e taninos, porém não foi evidenciado o constituinte químico alcaloide. Abeysinghe [44] realizou um estudo fitoquímico de extratos de folhas de *A. marina* revelando resultados similares quanto à presença de triterpenoides e flavonoides, no entanto divergiu da presente pesquisa em relação à presença de alcaloides e ausência de saponinas. Namazi et al. [45], em seu estudo com a *A. marina* observaram que esta planta apresentou atividade antiviral e evidenciaram no perfil fitoquímico que a mesma continha flavonoides, porém não mostraram a presença de alcaloides e taninos. Estudos realizados anteriormente mostraram que a *A. marina* é rica em compostos derivados de flavonoides [46,47,48,49,50]. O resultado encontrado nesta pesquisa difere do estudo supracitado em relação à ausência de taninos.

Na análise fitoquímica do extrato metanólico de folhas de *A. officinalis* foi verificada a presença de alcaloides e flavonoides [51]. Suganthi et al.[52], mostraram a presença de alcaloides no extrato metanólico de folhas desta planta. É importante salientar que as investigações fitoquímicas anteriores sobre as diferentes espécies de *Avicennia* mostraram componentes importantes como alcaloides, flavonoides e terpenoides [53]. Vadlapudi [54] demonstrou que extratos de *A. alba* apresentaram uma rica fonte de triterpenos, saponinas, flavonoides, alcaloides e taninos. Esses resultados diferem do presente estudo, apenas em relação à presença de alcaloides nestas espécies de *Avicennia*, visto que no *screening* fitoquímico de *A. schaueriana* não foi evidenciada a presença desse constituinte químico.

Na cromatografia gasosa dos extratos etanólicos de folhas e de caules de *A. schaueriana*, para os constituintes de natureza triterpênica, mostrou o isolamento das substâncias lupeol e lapachol. Desse modo, a *A. schaueriana* mostrou-se promissora para o isolamento de substâncias com potencial antifúngico, sendo que os caules são os que possuem atividade mais forte [55]. Além disso, Santos et al. [56] relataram que o extrato de *A. schaueriana* inibe o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (ATTC 6835), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), apresentando atividade antibacteriana. Essa propriedade antibacteriana está associada à presença de vários compostos químicos, na espécie vegetal, que apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica [57], tais como triterpenoides em *Avicennia tomentosa* [58] e *A. alba*

[12]; taninos e triterpenos em *A.marina* [59]; flavonóides [60] e saponinas em *A. officinalis* [61]. Extratos de *A. alba* também apresentaram atividade antimicrobiana contra espécies patogênicas testadas, incluindo cepas resistentes a antibióticos [54]. Entre os princípios ativos de plantas com potencial antimicrobiano, os flavonoides são um dos constituintes químicos encontrados na literatura científica para o gênero *Avicennia* [56]. Esses trabalhos corroboram com a presente pesquisa que evidenciaram a identificação desses metabólitos secundários na espécie estudada.

Então, sugere-se que novas investigações sejam realizadas com a *Avicennia schaueriana*, especialmente análises mais refinadas, como cromatografia gasosa e líquida, a fim de identificar quais substâncias pertencem a cada classe metabólica avaliada no presente estudo. Dessa forma, resultará na comprovação dos seus constituintes químicos, os quais possuem propriedades farmacológicas, dando subsídios para que essa planta apresente atividade medicamentosa, assim como outras espécies de *Avicennia*.

6. CONCLUSÃO

A planta do mangue *A.schaueriana* contém importantes metabólitos secundários, que sugerem possíveis atividades anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica. Porém, é recomendado que estudos adicionais sejam realizados para uma melhor compreensão do potencial farmacológico desta espécie.

7. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Nós declaramos que não há nenhum conflito de interesse.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, especialmente, o Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, que viabilizou o desenvolvimento da pesquisa; e a CAPES pelo apoio financeiro.

8. REFERÊNCIAS

- 1- Garcia ES. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. Cad Saude Publica 1995;11 Suppl 3:495-500.
- 2- Di Stasi LC. Arte, ciência e magia. In: Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Fundação Unesp; 1996. p. 1-175.
- 3- Wilson EO. A situação atual da biodiversidade biológica. In: Wilson EO. Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1997. p. 3-24.
- 4- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. p.156.
- 5- Rates SMK. Plants as source of drougs. Toxicon 2001; 39:603-13.
- 6- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 2006; 27 Suppl 1:1-93.
- 7- Santos PO, Barbosa Junior AM, Melo DLFM, Trindade RC. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). Revista Brasileira de Plantas Medicinais 2007; 9 Suppl 2:108-11.
- 8- Gesler WM. Therapeutic landscapes: medical issue in light of the new cultural geography. Soc Sci Med 1992; 34 Suppl 7:735-46.
- 9- Bent S, Ko R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. Am J Med 2004; 116 Suppl 7: 478-85.
- 10- Bandaranayake WM. Traditional and medicinal uses of mangroves. Mangroves and Salt Marshes 1998; 2:133-48.
- 11- Bandaranayake WM. Survey of mangrove plants from Northern Australia for phytochemical constituents and uv-absorbing compounds. Current Topics in Phytochemistry 1995; 14:60-72.
- 12- Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. Wetlands Ecology and Management 2002; 10:421-52.
- 13- Agoramoorthy G, Chandrasekaran M, Venkatesalu V, Hsu MJ. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your eye mangrove from India. Braz J Microbiol 2007; 38:739-42.
- 14- Harbone JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000; 55: 481-504.
- 15- Ahmed M, Akthar MS, Malik T, Gilani AH. Hypoglycaemic action of the flavonoids fraction of *Cuminum nigrum* seeds. Phytother Res 2000; 14:103-06.

- 16- Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-das-Dores RG, Santos AF, Nagem TJ. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2007; 28 Suppl 3: 241-49.
- 17- Arun LB, Arunachalam AM, Arunachalam KD, Annamalai SK, Amit Kumar K. In vivo anti-ulcer, anti-stress, anti-allergic, and functional properties of Gymnemic acid isolated from *Gymnema sylvestre* R. Br. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:70.
- 18- Scio E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* – Família Clusiaceae. *Revista Brasileira de Farmácia* 2004; 85 Suppl 1: 27-31.
- 19- Alves CF, Alves VBF, Assis IP, Clemente-Napimoga JT, Uber-Bucek E, Dal-Secco D, Cunha FQ, Rehder VLG, Napimoga MH. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61 Suppl 8: 1097-104.
- 20- Da Silva NLA, Miranda FAA, Da Conceição GM. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena* 2010; 6 Suppl 2: 1-17.
- 21- Sudhahar V, Kumar SA, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. *Vascul Pharmacol* 2007; 46 Suppl 6: 412-18.
- 22- Pertino M, Schmeda-Hirschmann G, Rodriguez JA, Theoduloz C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). *J Ethnopharmacol* 2007; 111 Suppl 3: 553-59.
- 23- Medeiros R, Otuki MF, Avellar MCW, Calixto JB. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Eur J of Pharmacol* 2007; 559 Suppl 2-3: 227-35.
- 24- Braga F, Ayres-Saraiva D, Gattas CR, Capella MAM. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 2007; 248 Suppl 1: 147-52.
- 25- Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A, Mioskowski C, Auwerx J, Saladin R. Antihyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem and Biophys Res Commun* 2007; 362 Suppl 4: 793-98.
- 26- Corrêa MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1984. p. 267-69.
- 27- Costa AF. *Farmacognosia*. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian; 1986.
- 28- Caballero-George C, Vanderheyden PML, Okamoto Y, Masaki T, Mbwambo Z, Apers S, Gupta MP, Pieters L, Vanquelin G, Vlitinek A. Evolution of bioactive saponins and

- triterpenoidal aglycons for their binding properties on human endothelin ETA and Angiotensin AT1 receptors. *Phytother Res* 2004; 18: 729-36.
- 29- Vinothapooshan G, Sundhar K. Wound healing effect of various extracts of *Adhatoda vasica*. *Int J Pharm Bio Sci* 2010; Suppl 1: 530-536.
 - 30- Chaudhari M, Mengi S. Evaluation of phytoconstituents of *Terminalia arjuna* for wound healing activity in rats. *Phytother Res* 2006; Suppl 20: 799-805.
 - 31- Murti K, Lambole V, Panchal M, Shah M, Gajera V 2011. Evaluation of wound healing activity of polyherbal formulation in rats. *J Pharmacogn Phytochem* 2011; Suppl 3: 112-115.
 - 32- Deshmukh PT, Fernandes J, Akarte A, Emmanuel T. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. *J Ethnopharmacol* 2009; Suppl 125: 178-181.
 - 33- Barros HM, Macedo SJ, Leça EE. Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2000.
 - 34- Profice SR, Kameyama C, Côrtes ALA, Braz DM, Indriunas A, Vilar T et. al. *Acanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2010. p.871.
 - 35- Barroso GM. Sistemática das Angiospermas do Brasil. 2ed. Viçosa (MG): UFV Imprensa Universitária; 1991.
 - 36- Schaeffer-Novelli Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo: Universidade Federal da Bahia; 1995.
 - 37- Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC. Princípios ativos de plantas superiores. São Paulo: EDUFSCAR; 2003.
 - 38- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova* 2005; 28: 85-94.
 - 39- Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Campo Grande: UNIDERP; 2005.
 - 40- Degani ALG, Cass QB, Vieira PC. Cromatografia: um breve ensaio. *Atualidades em Química* 1998; 7: 21-5.
 - 41- Wagner H, Bladt S. *Plant Drugs Analysis – a thin layer chromatography atlas*. 2 nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1996.
 - 42- Honda NK, Garcez WS, Garcez FR, Conceição CA. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. Campo Grande (MS): EUFMS; 1990.
 - 43- Amaral MPH, Vieira FP, Leite MN, Amaral LH, Pinheiro LC, Fonseca BG et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. *Rev Bras Farmacogn* 2009; 19 Suppl 2B: 607-11.

- 44- Abeysinghe PD. Antibacterial Activity of some Medicinal Mangroves against Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria. *Indian J Pharm Sci* 2010; 72 Suppl 2:167-72.
- 45- Namazi R, Zabihollahi R, Behbahani M, Rezaei A. Inhibitory Activity of *Avicennia marina*, a Medicinal Plant in Persian Folk Medicine, against HIV and HSV. *Iran J Pharm Res* 2013; 12 Suppl 2: 435-43.
- 46- Rezaii Y. Study on pharmacognosy effect of *Avicennia marina*. Tehran: Tehran University; 1993.
- 47- Rui J, YueWei G and HuiXin H. Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina*. *Chin J Nat Med* 2004; 2: 16-9.
- 48- Jia R, Guo YW, Hou HX. Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina*. *Chin J Nat Med* 2004; 2: 16-9.
- 49- Shraf M, El-Ansari MA, Saleh NAM. New flavonoids from *Avicennia marina*. *Fitoterapia* 2000; 71: 274-7.
- 50- Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in-vitro. *Antiviral Res* 2005; 67: 24-30.
- 51- Hossain H, Howlader SI, Dey SK, Hira A, Ahmed A. Evaluation of Diuretic and Neuropharmacological Properties of the Methanolic Extract of *Avicennia officinalis* L. leaves from Bangladesh. *International journal of pharmaceutical and phytopharmacological research* 2012; 2 Suppl 1: 2-6.
- 52- Suganthi N, Pandian SK, Devi KP. Cholinesterase inhibitory effects of *Rhizophora lamarckii*, *Avicennia officinalis*, *Sesuvium portulacastrum* and *Suaeda monica*: Mangroves inhabiting an Indian coastal area (Vellar Estuary). *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009; 24 Suppl 3: 702-7.
- 53- Ghani A. Medicinal Plants of Bangladesh: Chemical constituents and uses. Asiatic Society of Bangladesh; 1998. p. 212-16.
- 54- Vadlapudi V. In vitro antimicrobial activity of plant extracts of *Avicennia alba* against some important pathogens. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 2 Suppl 1: 408-11.
- 55- Fardin KM, Young CM. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica em *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, 18º Reunião Anual do Instituto de Botânica, São Paulo, 2011.
- 56- Santos SC, Ferreira FS, Damião AO, Damião AO, Barros TF, Rossi-Alva JC et. al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. *Ver Bras Farmacogn* 2010; 20 Suppl 1: 124-9.
- 57- Bloor SJ. A survey of extracts of New Zealand indigenous plants for selected biological activities. *New Zealand Journal of Botany* 1995; 33:523-40.

- 58- Majumdar SG, Patra G. Chemical investigation of some mangrove species: part I genus *Avicennia*. Journal of the Indian Chemical Society 1979; 56: 111-13.
- 59- Padmakumar K, Ayyakkannu K. Antiviral activity of marine plants. Indian J Vir 1997; 13: 33-6.
- 60- Basak UC, Das AB, Das P. Chlorophyll, carotenoids, proteins and secondary metabolites in leaves of 14 species of mangroves. Bulletin of marine Science 1996; 58: 654-59.
- 61- Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN. Biological activity of limonoids from the rutales. Phytochemistry 1992; 31: 377-94.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 2

ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*: DESENVOLVIMENTO DE UM CREME CICATRIZANTE

Caroline Maria Igrejas Lopes^{a*}, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira^b, Ivone Antônia de Souza^c, Erwelly Barros de Oliveira^b, Jéssica Guido de Araújo^b, Marllon Alex Nascimento Santana^b, Pedro Paulo Marcelino Neto^b, Liriane Baratella-Evêncio^b.

^aPrograma de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

^bDepartamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cDepartamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mails: carol_igrejas@hotmail.com, jeymesson@gmail.com, liriane@uol.com.br,

1. RESUMO

Relevância etnofarmacológica: A *Avicennia schaueriana* é uma espécie vegetal endêmica pertencente à família Verbenaceae, encontrada nas florestas de mangue do litoral brasileiro. As espécies do gênero *Avicennia* são muito utilizadas pelas comunidades tradicionais para cura de várias doenças.

Objetivo do estudo: Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* e a ação cicatrizante do creme desse extrato nas feridas cutâneas em ratos.

Materiais e métodos: A avaliação citotóxica foi realizada através do método colorimétrico de brometo (MTT) em células Vero. A ação cicatrizante foi avaliada utilizando 45 ratos divididos em três grupos iguais (n=15) tratados durante 5, 10 e 15 dias com creme de extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana*, solução de cloreto de sódio a 0,9% e creme de dexpanthenol, aplicados sobre a região dorsal previamente tricotomizada e lesionada. Foram realizadas mensurações iniciais e finais de cada ferida para calcular o índice de cicatrização das úlceras, assim como a análise histomorfométrica e a contagem dos fibroblastos nas secções histológicas das feridas cirúrgicas nos diferentes grupos e intervalos de tempo.

Resultados: O extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* não foi considerado citotóxico, pois apresentou capacidade de proliferação de células Vero na maior concentração testada (100µg/mL) ($p \leq 0,05$; Teste ANOVA com comparações de Tukey). Na análise morfométrica verificou-se que o percentual médio de contração das feridas, após 10 dias de tratamento, foi mais elevado no grupo medicado com dexpanthenol (93,41%) ($p \leq 0,05$; Teste ANOVA com comparações de Tukey). No tempo de 15 dias, o menor percentual médio de contração ocorreu no grupo do dexpanthenol (94,41%) e o maior no grupo de *A. schaueriana* (98,50%) ($p \leq 0,05$; Teste ANOVA com comparações de Tukey). Na histomorfometria, após 10 dias do procedimento cirúrgico, o grupo do dexpanthenol apresentou o menor comprimento médio não reepitelizado, não demonstrando diferença significativa com o grupo de *A. schaueriana*, mas apresentando com o soro fisiológico ($p \leq 0,05$; Teste Kruskal-Wallis). No período de 15 dias, a média foi nula no grupo da planta estudada, indicando 100% de reepitelização das feridas. Evidenciou-se também, que após 10 dias, o número médio de fibroblastos encontrado no grupo *A. schaueriana* foi mais elevado do que o soro fisiológico ($p \leq 0,05$; Teste Kruskal-Wallis). No período de 15 dias, o grupo *A. schaueriana* manteve uma maior quantidade de fibroblastos que os demais grupos ($p \leq 0,05$; Teste Kruskal-Wallis).

Conclusão: A espécie *A. schaueriana* não apresenta atividade citotóxica. Além disso, a aplicação tópica do creme de extrato aquoso desta planta diminui a área da ferida, estimula a reepitelização e aumenta o número de fibroblastos, exibindo uma ação cicatrizante mais eficiente nas feridas cutâneas em ratos do que o creme de dexpanthenol. Portanto, a espécie *A. schaueriana* poderá tornar-se um tratamento de uso tópico no processo de reparação tecidual.

Palavras-chaves: Avicennia, Técnicas In Vitro, Células Vero, Cicatrização, Reepitelização.

2. ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The *Avicennia schaueriana* is an endemic plant species of the Verbenaceae family, found in the mangrove forests of the Brazilian coast. The species of the *Avicennia* gender are heavily used by traditional communities for healing various diseases. Aim of the study: To evaluate the cytotoxicity *in vitro* of the aqueous extract of *A. schaueriana* leaves and the healing action of the cream of this extract in skin wounds in mice. Materials and Methods: The cytotoxic evaluation was performed using the colorimetric method of bromide (MTT) in Vero cells. The cicatrizing activity was evaluated using 45 mice, divided into three equal groups (n=15) treated for 5, 10 and 15 days with the cream of

the aqueous extract of *A. schaueriana* leaves, solution of sodium chloride at 0.9% and cream of dexpanthenol, applied to the dorsal region previously shaved and injured. Thus, the initial and final measurements of each wound were taken to calculate the rate of healing of the ulcers, as well as the histomorphometric analysis and the count of fibroblasts of histological sections of surgical wounds in the different groups and timeslots.

Results: The aqueous extract of *A. schaueriana* leaves was not considered cytotoxic, as it presented Vero cell proliferation capacity at the highest concentration tested (100µg/ml) ($p \leq 0,05$; ANOVA test with Tukey comparisons). In the morphometric analysis, it was found that the average percentage of contraction of the wounds, after 10 days of treatment, was higher in the group medicated with dexpanthenol (93.41%) ($p \leq 0,05$; ANOVA test with Tukey comparisons). In the 15 days analysis, the lowest average percentage of contraction was observed in the dexpanthenol group (94.41%) and the highest in the *A. schaueriana* group (98.50%) ($p \leq 0,05$; ANOVA test with Tukey comparisons). In the histomorphometry, after 10 days of the surgery, the dexpanthenol group had the lowest average length not re-epithelialized, showing no significant statistical difference from the *A. schaueriana* group, but showing with saline solution ($p \leq 0,05$; Kruskal-Wallis test). In the 15-days period, the average was void in the group of the studied plant, indicating 100% of re-epithelialization of the wounds. It was also noticed that after 10 days, the average number of fibroblasts found in the *A. schaueriana* group was higher than the saline solution ($p \leq 0,05$; Kruskal-Wallis test). In the 15-days period, the *A. schaueriana* group maintained a higher amount of fibroblasts when compared to the others ($p \leq 0,05$; Kruskal-Wallis test).

Conclusion: The species *A. schaueriana* present no cytotoxic activity. Furthermore, the topical application of the cream of aqueous extract of this plant decreases the wound area, stimulates the re-epithelialization and increases the number of fibroblasts, presenting a healing action more efficient, on mice skin wounds, than dexpanthenol cream. Therefore, the species *A. schaueriana* could become a topical treatment in the tissue repair process.

Key-words: Avicennia, In Vitro Techniques, Vero Cells, Wound Healing, Re-Epithelialization.

3. Introdução

A ferida é definida como a separação dos tecidos do corpo ou qualquer lesão tecidual, seja epitelial, mucosa ou em órgão, com prejuízo de suas funções básicas. Ela pode ser produzida por fatores extrínsecos – como incisão cirúrgica, lesões acidentais, corte e trauma – ou por fatores intrínsecos, como aquelas produzidas por infecção, alterações vasculares, defeitos metabólicos ou neoplasias (Centre for Medical Education, 1994).

Recentemente, o estudo de cicatrização de feridas tem se tornado um tema relevante, uma vez que inúmeras pessoas sofrem com feridas cirúrgicas ou traumáticas a cada ano, apresentando a necessidade iminente de tratamento das mesmas (Li et al., 2015). A perda do epitélio e a exposição do tecido conjuntivo que caracterizam as úlceras causam dor e desconforto, afetando a qualidade de vida dos pacientes (Duarte et al., 2011).

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo intrínseco de reconstrução de estruturas celulares e camadas de tecidos perdidos (Li et al., 2015), constituindo uma cascata perfeitamente coordenada de acontecimentos celulares e moleculares que interagem de modo a promover a reparação dos tecidos (Duarte et al., 2011). Esse processo é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo (Broughton et al., 2006). É um processo fisiológico altamente orquestrado, envolvendo esforços colaborativos de vários tipos de células da pele localizadas na epiderme e derme (Martin, 1997).

As populações de células predominantes para a cicatrização adequada de toda a espessura da ferida são os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (Barrientos et al., 2008). Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo responsáveis pela deposição de colágeno que é necessária para reparar o dano do tecido (Ross, 1969). Caso não haja algum fator modificador do reparo nas feridas, o processo de cicatrização ocorre em sequência ordenada e eficiente de eventos (Campos et al., 2007; Diegelmann e Evans, 2004), que em geral é dividida em três fases principais: fase inflamatória, fase de proliferação ou granulação e fase de remodelação ou maturação (Clark, 2005; Gurtner et al., 2008). Entretanto, alguns autores, como Diegelmann e Evans (2004), afirmam que a cicatrização é caracterizada por quatro fases distintas e sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação.

Vários autores têm investigado medicamentos que possam acelerar a cicatrização de feridas, reduzir os sintomas dolorosos e apresentar uma ótima relação custo-benefício (Duarte et al., 2011). Existem várias opções de tratamento tópico para as úlceras – como medicações anti-inflamatórias, agentes antimicrobianos, anestésicos, películas de proteção e laser – que

podem ser usadas isoladamente ou em combinação (Duarte et al, 2011). Ademais, estudos têm sugerido que os antioxidantes podem desempenhar um importante papel no processo cicatricial das lesões (Kim et al., 2008).

É importante salientar que, a partir do ponto de vista clínico, a aplicação tópica da medicação por toda a espessura da lesão é interessante, devido à redução dos efeitos adversos sobre outros órgãos (Li et al., 2015). O tratamento tópico de úlceras consiste em restaurar o ambiente fisiológico no leito da lesão, visando manter uma umidade adequada, controle de temperatura, regulação de pH, controle da carga bacteriana, remoção do tecido não-viável (desbridamento), controle do odor, minimização da dor e proteção da pele na região afetada. Estas condições, umas vez ajustadas, irão contribuir para o reparo e restauração da função tecidual. Nenhum tratamento tópico será eficaz se a condição patológica do paciente não for corrigida (Rolstad et al., 2012).

Dessa forma, historicamente, as plantas têm sido uma fonte de inspiração para compostos farmacêuticos novos, os quais têm feito grandes contribuições para a saúde humana (Vadlapudi, 2012), pois contêm componentes de valor terapêutico (Panda et al., 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as plantas são uma fonte de compostos que têm a capacidade para combater doenças, apresentando atividades antimicrobiana, antiviral e antifúngica (Gazim et al., 2008; Nascimento et al., 2000). Entretanto, os produtos fitoterápicos só podem ser introduzidos na sociedade desde que estudos laboratoriais e clínicos específicos comprovem sua eficácia e segurança (Agra et al., 2007), visto que alguns deles podem apresentar efeitos colaterais e/ou serem tóxicos. Portanto, a utilização adequada de plantas medicinais representa um passo importante e mais uma opção medicamentosa a ser destinada à população na tentativa de melhorar sua saúde e qualidade de vida (Silva et al., 2006).

Os extratos de diferentes plantas de mangue são relatados por possuírem diversas propriedades medicinais (Agoramoorthy et al., 2007; Bandaranayake, 1998). Em relação às propriedades farmacológicas da família Verbenaceae, segundo Bandaranayake (1998), as plantas do mangue *A. alba*, *A. africana*, *A. germinans* e *A. marina* apresentam componentes terapêuticos que podem ser utilizados para o tratamento de várias enfermidades, entre elas, as úlceras. Sumithra et al. (2011), abordaram que o extrato metanólico de folhas de *A. officinalis* tem mostrado atividade anti-inflamatória, sendo usada principalmente para o tratamento de reumatismo, paralisia, asma, doenças de pele e úlceras (Kathiresan e Ramanathan, 1997; Ramanathan, 2000).

O gênero *Avicennia* apresenta duas espécies no Brasil, a *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans* (Profice et al., 2010). A *Avicennia schaueriana* conhecida popularmente como mangue-preto ou siriúba, é uma espécie endêmica da vegetação de manguezal pertencente à família Verbenaceae (Schaeffer-Novelli, 1995). O extrato desta planta foi aplicado para inibição do crescimento *in vitro* das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATTC 6835), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), apresentando atividade antibacteriana (Santos et al., 2010). Além disso, a *A. schaueriana* mostrou-se promissora para o isolamento de substâncias com potencial antifúngico, sendo os extratos etanólicos de caules os que possuem atividade antifúngica mais forte (Fardin e Young, 2011).

É importante ressaltar que as espécies do gênero *Avicennia* são muito utilizadas pelas comunidades tradicionais para cura de várias doenças (Santos et al., 2010), porém ainda não existem relatos científicos sobre o potencial cicatrizante de *A. schaueriana*. Portanto, o objetivo deste artigo é avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a ação cicatrizante do creme de extrato aquoso de folhas de *Avicennia schaueriana* nas lesões cutâneas em ratos.

4. Materias e métodos

4.1. Material vegetal

As folhas da espécie *Avicennia schaueriana* foram coletadas em outubro de 2013, no mangue da Ilha de Itamaracá, situado em Vila Velha, no litoral norte do Estado de Pernambuco, Brasil, entre as coordenadas 07°48.716' latitude sul e 34°51.347' longitude oeste. Uma exsicata do material botânico encontra-se depositada no acervo do Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o número de registro UFP 75.458.

4.2. Material biológico

4.2.1. Obtenção do extrato aquoso de folhas de Avicennia schaueriana

O extrato aquoso foi obtido por infusão a partir de 500g de folhas frescas de *Avicennia schaueriana*. O material foi pesado, triturado e extraído com água à 40°C por 20 minutos. O resíduo sólido foi removido por filtração e a água por liofilização. Por sua vez, o material seco

foi estocado à -20°C. O rendimento do extrato aquoso foi de 4%, sendo utilizado para a atividade citotóxica e cicatrizante.

4.2.2. Cultura celular

Foram utilizadas células Vero que são fibroblastos, originárias do rim de macaco verde africano ou macaco do velho mundo (*Cercopithecus aethiops*). Essa linhagem celular (CCL-81, Rio de Janeiro, Brasil) foi obtida do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia (UFPE). As células Vero foram cultivadas no meio de cultura Eagle Modificado por Dulbeco (DMEM - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) complementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (10.000 unidades de penicillina, 10 mg de estreptomicina em 0.9% de cloreto de sódio; Sigma), sendo mantidas na estufa a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.2.3. Confeção do creme de *Avicennia schaueriana*

O extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* foi pesado em balança analítica digital (Shimadzu ATY 224) com a utilização de papel manteiga até atingir 3g e vertido em gral de porcelana. Em seguida foi solubilizado com água destilada e homogeneizado. Em um vidro de relógio, pesou-se a emulsão aniônica até atingir 60g e verteu-se no gral contendo o extrato de *A. schaueriana* até total solubilização. Foi aferido o pH e mantido entre 5,5 e 6,5. Por último, foi envasado em pote plástico compondo o extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* a 5% em creme.

4.2.4. Animais experimentais

Foram utilizados 45 ratos fêmeas da linhagem *Wistar* com idade entre 8 e 12 semanas, pesando 230 ± 20 g, obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos do CCB/UFPE. Os experimentos com os animais foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o número 23076025194/2012-10 (Anexo 2).

4.3. Teste de citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada através do método colorimétrico de brometo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (MTT) (Geran et al., 1972; Mosmann, 1983). A metodologia utilizada para a realização desse teste seguiu as normas da *International Standard Organization* (ISO) 10993-5 (2009).

Dessa forma, as células na concentração de 2×10^5 /mL de DMEM por poço foram distribuídas em placas de 96 poços (TPP, Darmstadt, Alemanha) e incubadas por 24h a 37°C em estufa, com atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ e 95% de ar para estabilização. Após esse período, foi adicionado nos poços com as células Vero o extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana*, previamente dissolvido em tampão fosfato-salino (PBS) e filtrado (Filtro para seringa 0.22µm – TPP, Darmstadt, Alemanha), nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. O PBS e o meio de cultura DMEM foram utilizados como controle. Após a incubação por 24h de contato das células com o extrato, 25µl (5mg/mL) de solução de MTT foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada na estufa por 3 horas. O MTT e o meio de cultura foram então removidos e 25µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. Posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (Bio-Rad, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 570nm. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.4. Ação cicatrizante

4.4.1. Divisão dos grupos

Para avaliação da ação cicatrizante, os ratos foram divididos ao acaso em 3 grupos, conforme o tratamento proposto para as úlceras induzidas em cada animal:

- Grupo controle: 15 animais em cujas feridas foi aplicada gaze embebida com solução de cloreto de sódio a 0,9%;
- Grupo padrão: 15 animais cujas úlceras foram tratadas com creme de dexpanthenol (Bepantol® creme, 5% dexpanthenol, Bayer, Alemanha), aplicada com uma paleta de forma a cobrir toda a lesão; e
- Grupo experimental: 15 ratos em cujas feridas foi aplicado o creme de extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* a 5%.

Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos de 5 animais, acompanhados durante o intervalo de tempo de 5, 10 e 15 dias após a indução da úlcera dorsal.

4.4.2. Procedimentos cirúrgicos em tecidos lesados in vivo

Os animais foram previamente pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg, Ketamin®), cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg, Anasedan®) e soro fisiológico a 0,9%, associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. Em seguida, cada rato foi submetido à demarcação da área para indução da ferida com posterior tricotomia na região dorsal e posicionado na mesa operatória em decúbito ventral. Após a assepsia da região dorsal com álcool 70%, foi realizada a indução de uma ferida retangular com cerca de 2,3 cm de comprimento e 2,0 cm de largura na pele do rato. Para isso, foi retirado um fragmento cutâneo no centro da área tricotomizada até a exposição da fáscia muscular dorsal, com a utilização de um bisturi nº 15.

4.4.3. Pós-operatório das feridas cutâneas

Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram submetidos ao tratamento correspondente e acondicionados em gaiolas; as úlceras não receberam curativos oclusivos. A aplicação da medicação referente a cada grupo foi realizada, diariamente, uma vez por dia, por volta das 11h00min, até o final do experimento. Além disso, o aspecto da ferida foi descrito ao longo da pesquisa nos diferentes grupos.

No 5º dia, foi realizada a medição da área da ferida (largura e comprimento) com o auxílio de um paquímetro, porém sem a retirada do fragmento cutâneo. Por sua vez, após 10 e 15 dias, foram realizadas a medição da área da lesão e retirada do fragmento cutâneo contendo a ferida. Para a realização desse procedimento, os animais foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, e com o auxílio de um bisturi nº 15, as peças cirúrgicas foram excisionadas, sendo constituídas da cicatriz ou lesão cutânea, com margem de 1 cm de pele em torno da lesão e profundidade até a musculatura dorsal do animal. O tecido excisionado foi colocado em formol a 10% durante 24 horas a temperatura ambiente e processado para microscopia de luz. Após o procedimento de coleta dos fragmentos, os animais foram eutanasiados, através do deslocamento cervical e descartados segundo as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4.4. Análise morfométrica da ferida

Para a análise morfométrica foram realizadas mensurações iniciais e finais de cada ferida nos diferentes grupos e períodos, através de um paquímetro, para calcular o índice de cicatrização das úlceras. Para isso foi utilizado o grau de contração expresso em percentual pela equação proposta por Ramsey et al. (1995), sendo W_o a área inicial e W_i a área final:

$$\% \text{ de contração} = (W_o - W_i)/W_o \times 100$$

4.4.5. Estudo histomorfométrico

Após a fixação dos espécimes retirados, as amostras foram encaminhadas para processamento em padrão convencional de técnica histológica para microscopia de luz, com inclusão em parafina. Cortes seriados de 5 μm foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE), montados com “entellan” e observados em microscópio óptico.

As secções histológicas selecionadas foram visualizadas em um scanner de lâminas (3DHISTECH) para captura de imagens. Para a avaliação da reepitelização, as distâncias não epitelizadas das feridas foram mensuradas com o programa Pannoramic Viewer, com aumento de 2x, nas amostras coletadas de cada animal nos tempos de 10 e 15 dias de tratamento. Além disso, foi realizada a contagem de fibroblastos. Dessa forma, foram adquiridos 5 campos por preparação sob o aumento de 40 vezes e quantificados através do software ImageJ 1.48.

4.5. Análise estatística

Os dados do estudo *in vitro* foram expressos através das medidas estatísticas: média, desvio padrão, coeficiente de variação, mediana, valor mínimo e valor máximo. Os dados foram avaliados segundo o teste F (ANOVA) com comparações múltiplas de Tukey. Para a verificação da hipótese de igualdade de variâncias, foi realizado o teste F de Levene.

Os dados das análises morfométrica e histomorfométrica e da contagem dos fibroblastos foram expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média) e mediana. No estudo morfométrico, foi utilizado o teste F (ANOVA) no contraste entre os grupos (soro fisiológico, dexpanthenol e *A. schaueriana*), com comparações múltiplas de Tukey para avaliar os percentuais de contração com 5, 10 e 15 dias, e o teste *t-Student* pareado na comparação entre

as medições inicial e final. No estudo histomorfométrico e na contagem dos fibroblastos, os dados foram avaliados através dos testes estatísticos Kruskal-Wallis na comparação entre os grupos e Mann-Whitney para a comparação entre os tempos de avaliação (10 e 15 dias). Os cálculos estatísticos foram realizados com o programa SPSS na versão 21.0 e a margem de erro utilizada nas decisões foi de 5,0%.

5. Resultados

5.1. Citotoxicidade

Observa-se na tabela 1 que a média do PBS (0,438) e da concentração de 25µg/mL (0,437) apresentaram diferenças estatísticas em relação às concentrações de 100 µg/mL (0,686) e 6,25 µg/mL (0,710), apresentando estas últimas uma maior proliferação das células Vero. Em contrapartida, o DMEM (0,533) não exibiu diferença estatisticamente significativa com todas as concentrações testadas.

Tabela 1 – Medidas do número de células Vero em concentrações decrescentes de *Avicennia schaueriana* e em DMEM e PBS.

Concentração	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação	Mediana	Mínimo	Máximo
DMEM	0,533 ^(AB)	0,186	34,897	0,514	0,250	0,832
PBS	0,438 ^(B)	0,196	44,748	0,426	0,194	0,822
100 µg/mL	0,686 ^(A)	0,191	27,842	0,662	0,482	0,995
50 µg/mL	0,567 ^(AB)	0,208	36,684	0,486	0,383	1,061
25 µg/mL	0,437 ^(B)	0,144	32,952	0,379	0,315	0,731
12,5 µg/mL	0,626 ^(AB)	0,144	23,003	0,607	0,402	0,892
6,25 µg/mL	0,710 ^(A)	0,114	16,056	0,690	0,565	0,929
Valor de p $p^{(1)} < 0,001^*$						

(*): Diferença significativa $\leq 5\%$.

(1): Através do teste F (ANOVA) com comparações de Tukey.

Obs. As letras distintas entre parênteses apontam diferenças significativas entre as concentrações correspondentes.

5.2. Descrição macroscópica das feridas

A Figura 1 mostra o processo de cicatrização das feridas induzidas nos ratos. As imagens digitais permitiram o acompanhamento da evolução da área da ferida nos diferentes tempos experimentais, de acordo com o tratamento.

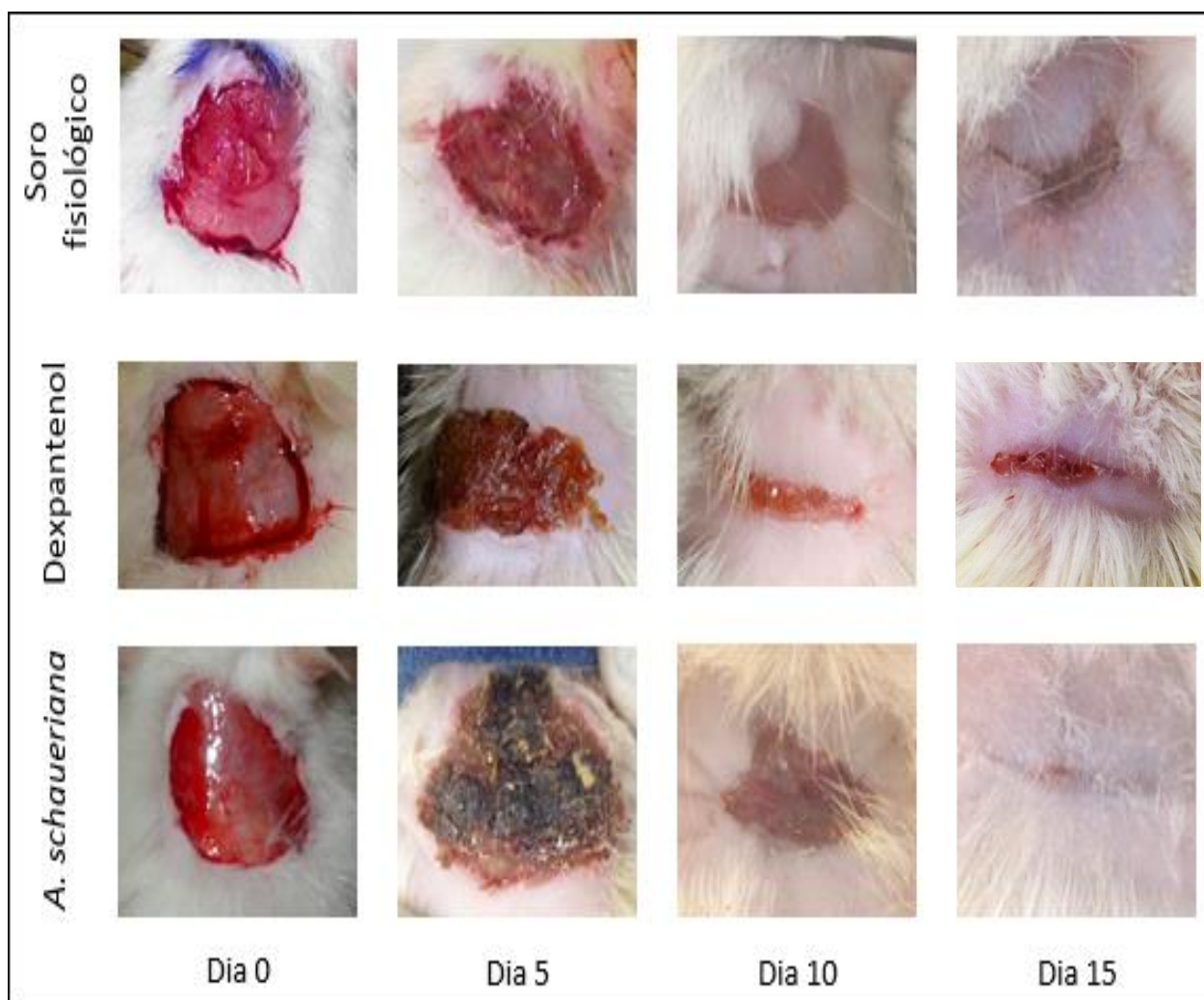


Figura 1. Processo de cicatrização das feridas em diferentes dias e tratamentos

O quadro 1 resume o aspecto macroscópico das feridas induzidas na região dorsal dos ratos no intervalo de 5, 10 e 15 dias.

Quadro 1 – Descrição do aspecto macroscópico das feridas induzidas na região dorsal dos ratos no intervalo de 5, 10 e 15 dias.

		Período de avaliação		
		5 dias	10 dias	15 dias
Grupos	Soro fisiológico	Quatro ratos apresentaram feridas infectadas com presença de sangramento. Um rato apresentou a ferida úmida.	Quatro animais apresentaram feridas com tecido de granulação e um animal com formação de crosta.	Dois ratos havia a presença de tecido de granulação e em três animais a formação de crosta
	Dexpantenol	Dois ratos apresentaram infecção nas feridas e os demais apresentaram feridas úmidas, sem infecção.	Todos os ratos apresentaram tecido de granulação e formação de crosta.	Todos exibiram presença de crosta.
	<i>A. schaueriana</i>	Todos os ratos exibiram feridas secas, com formação de crosta, sem presença de infecção.	Verificou-se presença de crosta em todos os ratos.	Dois ratos apresentaram reepitelização das feridas (presença de cicatriz) e os outros 3 exibiram presença de pequena crosta.

5.3. Análise morfométrica das feridas

Verifica-se na tabela 2 que a média das áreas da ferida diminuiu com a progressão do tempo de avaliação e que houve um aumento do percentual médio de contração da ferida em cada um dos grupos estudados. Na avaliação após 10 dias, o grupo tratado com dexpantenol apresentou a média da área menos elevada ($30,30 \text{ mm}^2$) com o percentual médio de contração de 93,41% ($p \leq 0,05$). Porém, na análise após 15 dias, a média da área mais elevada ocorreu no grupo do dexpantenol ($25,70 \text{ mm}^2$) com o menor percentual médio de contração (94,41%) e a área menos elevada ocorreu no grupo tratado com *A. schaueriana* ($6,90 \text{ mm}^2$) com o maior percentual médio de contração (98,50%), sendo verificada diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Medidas da área da ferida (mm²) e o percentual de contração da ferida de acordo com o grupo e o tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico *in vivo*.

Tempo de avaliação após a indução da ferida	<i>A. schaueriana</i> (n=15) Média + EPM (Mediana)	Soro fisiológico (n=15) Média + EPM (Mediana)	Dexpantenol (n=15) Média + EPM (Mediana)	Valor de p
Inicial	460,00 ± 0,00 (460,00)	460,00 ± 0,00 (460,00)	460,00 ± 0,00 (460,00)	
5 dias	262,30 ± 22,98 (256,50)	227,60 ± 22,55 (230,00)	238,04 ± 39,05 (260,00)	p ⁽¹⁾ = 0,698
10 dias	93,31 ± 10,41 ^(A) (97,50)	93,60 ± 17,22 ^(A) (88,00)	30,30 ± 4,29 ^(B) (34,00)	p ⁽¹⁾ = 0,003*
15 dias	6,90 ± 2,98 ^(A) (8,00)	17,71 ± 3,81 ^(AB) (16,00)	25,70 ± 3,47 ^(B) (24,00)	p ⁽¹⁾ = 0,008*
Valor de p	p ⁽²⁾ = 0,001*	p ⁽²⁾ = 0,001*	p ⁽²⁾ = 0,005*	
	p ⁽³⁾ < 0,001*	p ⁽³⁾ < 0,001*	p ⁽³⁾ < 0,001*	
	p ⁽⁴⁾ < 0,001*	p ⁽⁴⁾ < 0,001*	p ⁽⁴⁾ < 0,001*	
% contração com 5 dias	42,98 ± 4,99 (44,24)	50,52 ± 4,90 (50,00)	48,25 ± 8,49 (43,48)	p ⁽¹⁾ = 0,698
% contração com 10 dias	79,72 ± 2,26 ^(A) (78,80)	79,65 ± 4,74 ^(A) (80,87)	93,41 ± 0,93 ^(B) (92,60)	p ⁽¹⁾ = 0,003*
% contração com 15 dias	98,50 ± 0,65 ^(A) (98,26)	96,15 ± 0,83 ^(AB) (96,52)	94,41 ± 0,75 ^(B) (94,78)	p ⁽¹⁾ = 0,008*

(*): Diferença significativa ≤ 5%.

(1): Através do teste F (ANOVA) para comparação entre os grupos em cada avaliação e para os percentuais de contração com 5 dias, 10 dias e 15 dias com comparações de Tukey.

(2): Através do teste de t-Student pareado para comparações entre as avaliações do tempo inicial e 5 dias em cada grupo.

(3): Através do teste de t-Student pareado para comparações entre as avaliações do tempo inicial e 10 dias em cada grupo.

(4): Através do teste de t-Student pareado para comparações entre as avaliações do tempo inicial e 15 dias em cada grupo.

Obs. As letras distintas entre parênteses apontam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

5.4. Análise Histomorfométrica e contagem dos fibroblastos

A tabela 3 destaca que, no período de 10 dias, a média da distância entre os epitélios da ferida cirúrgica foi mais elevada no grupo tratado com soro fisiológico (3498,66 μm) sendo o $p \leq 0,05$, a menor média foi observada no grupo do dexpantenol (706,28 μm) sem diferença estatisticamente significativa com o grupo de *A. schaueriana* (833,04 μm). Após 15 dias, em todos os grupos estudados, verificou-se que as distâncias médias entre os epitélios foram correspondentemente menores do que se comparado com o período de 10 dias, indicando um aumento da reepitelização, apresentando o grupo do soro fisiológico a distância mais elevada. É importante salientar que a média foi nula no grupo de *A. schaueriana*, no intervalo de 15 dias, indicando reepitelização completa das feridas em todos os ratos (Figura 2).

Tabela 3 – Distância entre os epitélios da ferida cirúrgica dos grupos em relação ao tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico *in vivo*.

Tempo de avaliação após a indução da ferida	<i>A. schaueriana</i> (n=10) Média + EPM (Mediana)	Soro fisiológico (n=10) Média + EPM (Mediana)	Dexpantenol (n=10) Média + EPM (Mediana)	Valor de p
10 dias	833,04 $\pm$ 515,65 ^(A) (0,00)	3498,66 $\pm$ 232,37 ^(B) (3572,98)	706,28 $\pm$ 233,73 ^(A) (704,84)	$p^{(1)} = 0,002^*$
15 dias	0,00 $\pm$ 0,00 (0,00)	968,89 $\pm$ 303,49 (905,04)	582,21 $\pm$ 370,34 (0,00)	$p^{(1)} = 0,078$
Valor de p	$p^{(2)} = 0,444$	$p^{(2)} = 0,008^*$	$p^{(2)} = 0,683$	

(*): Diferença significativa $\leq 5\%$.

(1): Através do teste de Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos em cada tempo de avaliação com comparações do referido teste.

(2): Através do teste de Mann-Whitney para comparações entre os tempos de avaliação em cada grupo.

Obs. As letras distintas entre parênteses apontam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

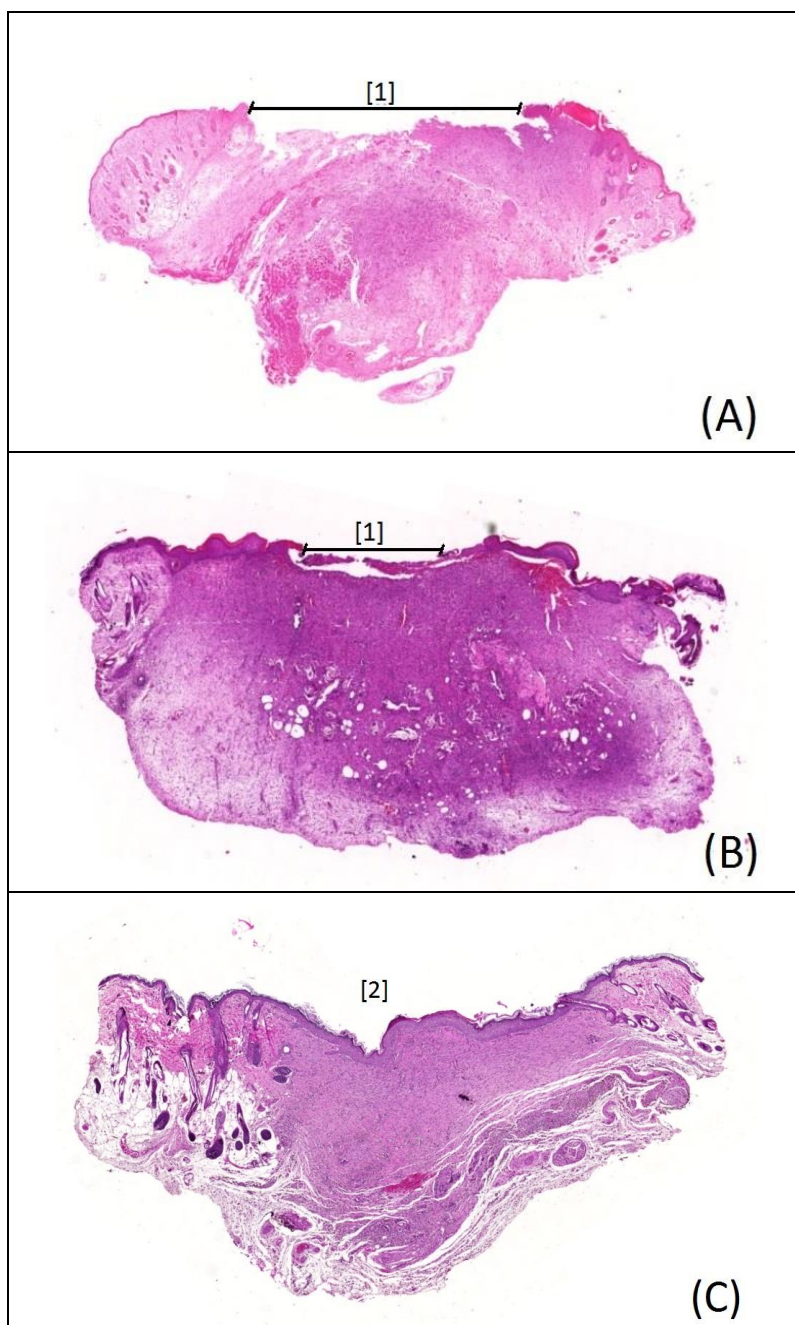


Figura 2. Secções histológicas de pele dorsal de ratos mostrando grupo controle (A), tratado com dexpanthenol (B) e medicado com *A. schaueriana* (C). Todas as imagens mostram o grau de reepitelização após 15 dias de tratamento: [1] distância entre os epitélios e [2] reepitelização total. Coloração HE. Aumento 2x.

Na Tabela 4 verifica-se que, no tempo de 10 dias, a média de fibroblastos foi maior no grupo de *A. schaueriana* (579,20) do que na apresentada pelo soro fisiológico ($p \leq 0,05$). Constatou-se também que, na avaliação realizada após 15 dias da indução da ferida, o número médio de fibroblastos encontrado no grupo medicado com o creme de *A. schaueriana* manteve-se mais elevado (568,40) em comparação aos demais ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 – Medidas da contagem de fibroblastos dos grupos em relação ao tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico *in vivo*.

Tempo de avaliação após a indução da ferida	<i>A. schaueriana</i> (n=10) Média + EPM (Mediana)	Soro fisiológico (n=10) Média + EPM (Mediana)	Dexpantenol (n=10) Média + EPM (Mediana)	Valor de p
10 dias	579,20 ± 60,67 ^(A) (527,00)	295,20 ± 26,47 ^(B) (276,00)	508,60 ± 46,83 ^(A) (537,00)	$p^{(1)} = 0,004^*$
15 dias	568,40 ± 53,60 ^(A) (543,00)	331,00 ± 35,57 ^(B) (338,00)	397,00 ± 45,40 ^(B) (421,00)	$p^{(1)} = 0,011^*$
Valor de p	$p^{(2)} = 1,000$	$p^{(2)} = 0,421$	$p^{(2)} = 0,222$	

(*): Diferença significativa $\leq 5\%$.

(1): Através do teste de Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos em cada tempo de avaliação com comparações do referido teste.

(2): Através do teste de Mann-Whitney para comparações entre os tempos de avaliação em cada grupo.

Obs. As letras distintas entre parênteses apontam diferenças significativas entre os grupos correspondentes.

6. Discussão

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, interativo e iniciado em resposta a um dano (Guo e Dipietro, 2010), cujo objetivo é restaurar a continuidade anatômica e funcional do tecido, sendo essencial para a manutenção da integridade do organismo (Barbul, 1990; Broughton et al., 2006; Thornton et al., 1997). Dessa forma, um grande número de investigações e estudos clínicos tem sido realizado com o intuito de melhorar o processo cicatricial das feridas (Das, 2013; Duarte et al., 2011; Gál et al., 2009; Li et al., 2015; Ulger et al., 2014) e consequentemente a qualidade de vida das pessoas.

Este é o primeiro estudo que aborda o potencial terapêutico em relação à cicatrização da espécie *Avicennia schaueriana*. É importante salientar que o gênero *Avicennia* possui constituintes químicos que podem apresentar diversas propriedades farmacológicas, como os alcaloides, taninos, flavonóides, saponinas e triterpenos (Abeyasinghe, 2010; Ghani, 1998; Vadlapudi, 2012), que contribuem para a ação medicamentosa desta planta.

Segundo a ISO 10993-1 (2009), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é um dos testes que serve para avaliação de biocompatibilidade de um determinado material ou extrato, sendo um passo importante para os ensaios em animais e ensaios clínicos. Dessa maneira, os resultados desta pesquisa mostraram que o extrato aquoso de folhas de *A. schaueriana* não foi considerado citotóxico, uma vez que em todas as concentrações testadas houve capacidade de proliferação de células Vero. Estudos com algumas espécies da família Verbenaceae apresentaram resultados semelhantes.

Akter et al. (2014), utilizando o extrato metanólico de folhas de *A. alba*, mostraram que essa planta apresentou potencial antitumoral pela citotoxicidade contra células cancerígenas, porém não demonstrou atividade citotóxica em células Vero. Behbahani et al. (2013) concluíram que o extrato metanólico de *A. marina* não afetou a viabilidade das células Vero, não demonstrando efeito citotóxico em concentrações iguais ou menores que 32 µg/mL. De acordo com Bueno et. al (2014), os taninos influenciam na fisiologia das células da pele através das suas propriedades farmacológicas, aumentando a proliferação celular. Sendo assim, o resultado do presente trabalho sugere uma ação mitogênica do extrato de *A. schaueriana* por possivelmente possuir este composto.

Em relação à inspeção das feridas operatórias foi observado que os grupos do soro fisiológico e do dexpanthenol apresentaram crostas e tecido de granulação com processos infecciosos das feridas durante o período do estudo. Entretanto, o grupo de *A. schaueriana* apresentou crostas e cicatriz sem infecção da ferida cirúrgica. Estes resultados podem ser explicados por diferentes mecanismos de ação dos compostos secundários presentes na planta, como flavonoides e taninos, que são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Ofori-Kwakye et al., 2011). Nesse sentido, Santos et.al (2010) mostraram que os extratos hidro-alcoólicos da casca, folha e raiz de *A. schaueriana* apresentaram atividade antibacteriana *in vitro*, a qual pode contribuir para a ação cicatrizante desta planta, diminuindo o risco de infecção da lesão, que é a causa mais provável de retardo na cicatrização de feridas (Leaper, et al., 2015).

A análise morfométrica revelou que a média das áreas da ferida diminuiu com a progressão do tempo de avaliação em todos os grupos estudados. Observou-se que o creme de dexpanthenol teve uma atuação excelente na cicatrização das lesões cutâneas dos ratos nos primeiros 10 dias em relação aos demais grupos. O creme de dexpanthenol é amplamente utilizado, pois indica melhorias na cicatrização de feridas (Heise et al., 2012; Oguz et al., 2015; Ulger et al., 2014), visto que penetra facilmente na pele em concentrações locais elevadas. Os efeitos mais significativos de formulações contendo dexpanthenol incluem a

estimulação da epitelização, granulação e o alívio de prurido (Ebner et al., 2002). Entretanto, após 15 dias de tratamento o grupo de *A.schaueriana* foi o que apresentou o maior percentual de cicatrização da ferida. Comprovou-se dessa maneira que a planta estudada estimulou significativamente a contração da ferida, acelerando o processo de cicatrização. Essa propriedade cicatrizante deve-se provavelmente aos teores elevados de flavonoides (Vinothapooshan e Sundhar, 2010), saponinas (Jiang et al., 1991) e taninos presentes na planta, pois esses compostos secundários possuem características adstringente e antimicrobiana, que parecem ser responsáveis pela contração da ferida e aumento da taxa de epitelização (Deshmukh et al., 2009).

Na análise histomorfométrica, a média da distância entre os epitélios da ferida cirúrgica foi significativamente mais elevada no grupo do soro fisiológico após 10 dias, sendo semelhante entre os grupos que utilizaram creme de dexpanthenol e de *A. schaueriana*. Na avaliação após 15 dias de tratamento, todos os animais medicados com o creme de *A.schaueriana* indicaram reepitelização completa das feridas. Isso pode ser atribuído à presença dos taninos nesta planta, pois eles contribuem para formação de uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, atuando em processos inflamatórios, causando uma reestruturação do epitélio e a neovascularização (Simões et al., 2010). Esta película pode exercer uma ação protetora isolando a ferida do ambiente, acelerando significativamente a reparação tecidual no grupo tratado com o creme de *A. schaueriana*.

Adicionalmente, no presente estudo, houve um aumento significativo na quantidade de fibroblastos no grupo de *A. schaueriana*, em comparação aos demais grupos, no intervalo de 15 dias. Ulger et al. (2014) acreditam que a melhora na taxa de cicatrização de feridas é devido ao aumento da proliferação de fibroblastos, bem como de uma epitelização acelerada. Além disso, outros estudos mostram a importância dos fibroblastos no processo cicatricial (Das, 2013; Diegelmann e Evans, 2004; Ebner et al., 2002; Khoshneviszadeh et al, 2014; Sonmez et al, 2015). Sugere-se que esta atividade estimuladora de fibroblastos da derme no grupo da planta estudada é devido à presença de taninos hidrolisáveis (Bueno et al., 2014).

Portanto, ressalta-se a importância da histomorfometria nos estudos, visto que somente a partir da análise microscópica foi possível avaliar o grau de reepitelização da ferida, mostrando que os grupos que utilizaram creme de dexpanthenol e de *A. schaueriana* foram superiores ao do soro fisiológico, pois obtiveram um processo cicatricial mais rápido e eficiente. De todos os grupos analisados, o que obteve os melhores resultados de cicatrização foi o de *A. schaueriana*. Contudo, são necessários mais estudos que comprovem o potencial

cicatrizante desta planta, além de pesquisar outras atividades terapêuticas que esta espécie possa apresentar.

7. Conclusão

Este estudo mostrou que a espécie *A. schaueriana* não apresenta atividade citotóxica. Além disso, a aplicação tópica do creme de extrato aquoso da planta *A. schaueriana* diminui a área da ferida, estimula a reepitelização e aumenta o número de fibroblastos, exibindo uma ação cicatrizante nas lesões cutâneas em ratos mais eficiente do que o creme de dexpanthenol. Portanto, com a realização de novas pesquisas, esta planta poderá se tornar um tratamento de uso tópico no processo de reparação tecidual, trazendo vários benefícios à população.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pernambuco, especialmente, ao Departamento de Histologia e Embriologia do CCB/UFPE e ao Biotério do Departamento de Antibióticos do CCB/UFPE, que viabilizaram o desenvolvimento da pesquisa; e a CAPES pelo apoio financeiro.

8. Referências

1. Abeysinghe, P.D., 2010. Antibacterial Activity of some Medicinal Mangroves against Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria. *Indian J. Pharm. Sci.* 72, 167-172.
2. Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., Hsu, M.J., 2007. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your eye mangrove from India. *Braz. J. Microbiol.* 38, 739–742.
3. Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 114-140.
4. Akter, R., Uddin, S.J., Grice, I.D., Tiralongo, E., 2014. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *J. Nat. Med.* 68, 246-252.
5. Bandaranayake, W.M., 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*. 2, 133–148.
6. Barbul, A., 1990. Immune aspects of wound repair. *Clin. Plast. Surg.* 17, 433-442.

7. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M.S., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16, 585-601.
8. Behbahani, M., Zadeh, M.S., Mohabatkar, H., 2013. Evaluation of antiherpetic activity of crude extract and fractions of *Avicenna marina*, in vitro. *Antiviral Res.* 97, 376-380.
9. Broughton, G., Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006. Wound healing: an overview. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 1-32.
10. Bueno, F.G., Panizzon, G.P., Mello, E.V., Lechtenberg, M., Petereit, F., de Mello, J.C., Hensel, A., 2014. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia.* 99,252-260.
11. Campos, A.C.L., Borges-Branco, A., Groth, A.K., 2007. Cicatrização de feridas. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 20, 51-58.
12. Clark, R.A.F., 2005. Wound repair, in: Kumar, Robbins, Cotran (7.ed.), *Pathologic Basis of Disease*. Saunders, pp.112;
13. Centre for Medical Education. *El programa de las heridas*. Scotland: The University of Dundee, 1994. 188 p;
14. Das, K., 2013. Wound healing potential of aqueous crude extract of *Stevia rebaudiana* in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 23, 351-357
15. Deshmukh, P.T., Fernandes, J., Akarte, A., Emmanuel, T., 2009. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. *J. Ethnopharmacol.* 125, 178-181.
16. Diegelmann, R.F., Evans, M.C., 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 9, 283-289.
17. Duarte, C.M.E., Quirino, M.R.S., Patrocínio, M.C., Anbinder, A.L., 2011. Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 16, e716-721
18. Ebner, F., Heller, A., Rippke, F., Tausch, I., 2002. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 427- 433.
19. Fardin, K.M., Young, C.M., 2011. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica em *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, 18º Reunião Anual do Instituto de Botânica, São Paulo.
20. Gál, P., Toporcer, T., Grendel, T., Vidová, Z., Smetana, K., Dvoránková, B., Gál, T., Mozes, S., Lenhardt, L., Longauer, F., Sabol, M., Sabo, J., Backor, M., 2009. Effect of *Atropa belladonna* L. on skin wound healing: biomechanical and histological study in rats and in vitro study in keratinocytes, 3T3 fibroblasts, and human umbilical vein endothelial cells. *Wound Repair Regen.* 17, 378–386.

21. Gazim, Z.C., Rezende, C.M., Fraga, S.R., Svidzinski, T.I., Cortez, D.A., 2008. Antibacterial activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L.(Asteracea) growing in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39, 61–63.
22. Geran, R.I., Greenberg, N.H., Mac donald, M.M., 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports.* 3, 208-209.
23. Ghani, A., 1998. Medicinal Plants of Bangladesh: Chemical constituents and uses. Asiatic Society of Bangladesh, p. 212-216.
24. Guo, S., Dipietro, L.A., 2010. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* 89, 219–229.
25. Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature.* 453, 314-321.
26. Heise, R., Skazik, C., Marquardt, Y., Czaja, K., Sebastian, K., Kurschat, P., Gan, L., Denecke, B., Ekanayake-Bohlig, S., Wilhelm, K.P., Merk, H.F., Baron, J.M., 2012. Dexpanthenol modulates gene expression in skin wound healing in vivo. *Skin Pharmacol. Physiol.* 25, 241-248.
27. ISO 10993-1, 2009. International standard: Biological evaluation of medical devices Part 1: Evaluation and testing in the risk management process.
28. ISO 10993-5, 2009. International standard: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods.
29. Jiang, Y., Haag-Berrurier, M., Antion, R., 1991. Structure of a new saponin from the bark of *Mimosa tenuiflora*. *J. Nat. Prod.* 54, 1247–1253
30. Kathiresan, K., Ramanathan, T., 1997. Medicinal Plants of Parangipettai Coast. Monograph, Annamalai University, India.
31. Khoshneviszadeh, M., Ashkani-Esfahani, S., Namazi, M.R., Noorafshan, A., Geramizadeh, B., Miri, R., 2014. Topical Simvastatin Enhances Tissue Regeneration in Full-thickness Skin wounds in rat models. *Iran. J. Pharm. Res.* 13, 263-269.
32. Kim, H., Kawazoe, T., Han, D.W., Matsumara, K., Suzuki, S., Tsutsumi, S., Hyon, S.H., 2008. Enhanced wound healing by an epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice. *Wound Repair Regen.* 16, 714-720.
33. Leaper, D., Assadian, O., Edmiston, C.E., 2015. Approach to chronic wound infections. *Br. J. Dermatol.* 1-8
34. Li, X., Wang, H., Rong, H., Li, W., Luo, Y., Tian, K., Quan, D., Wang, Y., Jiang, L., 2015. Effect of composite SiO₂@AuNPs on wound healing: In vitro and vivo studies. *J. Colloid Interface Sci.* 445, 312-319.

35. Martin, P., 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276, 75-81.
36. Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55-63.
37. Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31, 247-256.
38. Ofori-Kwakye, K., Kwapong, A.A., Bayor, M.T., 2011. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8, 218-223.
39. Oguz, A., Uslukaya, O., Alabalık, U., Turkoglu, A., Kapan, M., Bozdag, Z., 2015. Topical N-acetylcysteine improves wound healing comparable to dexpanthenol: an experimental study. *Int. Surg.* 100, 656-661.
40. Panda, S.K., Thatoi, H.N., Dutta, S.K., 2009. Antibacterial activity and phytochemical screening of leaf and bark extracts of *Vitex negundo* L. from Similipal biosphere reserve, Orissa. *J. Med. Plant. Res.* 3, 294-300.
41. Profice, S.R., Kameyama, C., Côrtes, A.L.A., Braz, D.M., Indriunas, A., Vilar, T., 2010. *Acanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p.871.
42. Ramanathan T., 2000. *Studies of Medicinal Plants of Parangipettai Coast (South East Coast of India)*. Thesis, Annamalai University, India.
43. Ramsey, D.T., Pope, E.R., Wagner-mann, C., Berg, J.N., Swain, S.F., 1995. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 56, 941-949.
44. Rolstad, B.S., Bryant, R.A., Nix, D.P., 2012. Topical management, in: Bryant, R.A., Nix, D.P. (Eds.), *Acute and chronic wounds: current management concepts*. Fourth ed. Elsevier Mosby, Missouri, pp. 289-306.
45. Ross, R., 1969. Wound healing. *Sci. Am.* 220, 40-50.
46. Santos, S.C., Ferreira, F.S., Damião, A.O., Damião, A.O., Barros, T.F., Rossi-Alva, J.C., Fernandez, L.G., 2010. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 124-129.
47. Schaeffer-Novelli, Y., 1995. *Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar*. 1.ed. Universidade Federal da Bahia, São Paulo.
48. Silva, M.I.G., Gondim, A.P.S., Nunes, I.F.S., Sousa, F.C.F., 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à Saúde da Família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 455-462.

49. Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Auler, I., Petrovick, P.R., 2010. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, sexta ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC.
50. Sonmez E, Turkdogan, K.A., Civelek, C., Dur, A., Gulen, B., Karayel, E., Gucin, Z., Sogut, O., 2015. The efficacy of absorbable polysaccharide haemostats in wound healing. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 26, 50-53
51. Sumithra, M., Janjanam, V.K., Kancharana, V.S., 2011. Influence of methanolic extract of *Avicennia officinalis* leaves on acute, subacute and chronic inflammatory models. *Int. J. Pharmtech Res.* 3, 763–768.
52. Thornton, F.J., Schäffer, M.R., Barbul, A., 1997. Wound healing in sepsis and trauma. *Shock*. 8, 391-401.
53. Ulger, B.V., Kapan, M., Uslukaya, O., Bozdog, Z., Turkoglu, A., Alabalık, U., Onder, A., 2014. Comparing the effects of nebivolol and dexpanthenol on wound healing: an experimental study. *Int. Wound. J.* 1-5.
54. Vadlapudi, V., 2012. In vitro antimicrobial activity of plant extracts of *Avicennia alba* against some important pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2, 408-411.
55. Vinothapooshan, G., Sundhar, K., 2010. Wound healing effect of various extracts of *Adhatoda vasica*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 1, 530-536.

ANEXO 1

INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

Instruction to Authors

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (Int J Pharm Pharm Sci) is peer reviewed, Monthly (Onward April 2014) open access Journal. IJPPS publishes original research work that contributes significantly to further the scientific knowledge in pharmacy and pharmaceutical sciences (Pharmaceutical Technology, Pharmacognosy, Natural Product Research, Pharmaceutics, Novel Drug Delivery, Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Computational Chemistry and Molecular Drug Design, Pharmacology, Pharmaceutical Analysis, Pharmacy Practice, Clinical and Hospital Pharmacy, Cell Biology, Genomics and Proteomics, Pharmacogenomics, Bioinformatics, Pharmacoeconomics). Research outcomes from medical sciences/case study and biotechnology of pharmaceutical interest are also considered. IJPPS publishes original research work either as an Original Article or as a Short Communication. Review articles on current topic under mentioned scopes are also considered for publication.

*Type-written manuscripts prepared using MS Word should be submitted by online submission system
(<http://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/about/submissions#onlineSubmissions>)
or email to editor@ijppsjournal.com

***(Article should be submitted through any one of the mode- email or online submission system).**

Online submission system must be preferred

Manuscripts will be subjected to peer review process to determine their suitability for publication provided they fulfill the requirements of the journal as laid out in the instructions to authors. After the review, manuscripts will be returned for revision along with reviewer's and/or editor's comments. Prepare the manuscript in Times New Roman font using a font size of 12. There shall not be any decorative borders anywhere in the text including the title page. All the tables and figures should be in the text at suitable place.

Submission of a manuscript to International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences for publication implies that the same work has not been either published or under consideration for publication in another Journal. Authors, in their cover note to the Editor, have to clearly mention whether the manuscript shall be considered as a Research Paper, Short Communication or Review Article and also confirm that the manuscript has not been submitted to any other Journal for publication. Authors publishing results from in vivo experiments involving animals or humans should state whether due permission for conduction of these experiments was obtained, from the relevant ethics committees, in the Materials and Methods section. In addition, authors wishing to publish research work involving human studies should also send a notary verified letter of approval from the Ethics Committee or the Institutional Review Board.

Manuscript should be divided into Title page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion or Results and Discussion, conclusions, Acknowledgements, References.

Title page- In separate lines, title page should contain the title of the manuscript, the name(s) and affiliation(s) of the author(s), and the mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author. The title must be specific, concise and informative.

Title - HEPTOPROTECTIVE ACTIVITY OF -----
(12 FONT SIZE, TIMES NEW ROMAN, NORMAL, BOLD)

Authors - Avijeet Jain, Amit K Jain -----
(12 FONT SIZE, TIMES NEW ROMAN, NORMAL, BOLD)

Keywords and abstract - Please include 3-10 keywords for indexing purposes; Full-length manuscript submission should contain an abstract of up to 250 words in a structured form, consisting of: Objective, Methods, Results, and Conclusion.

Headings – **INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSIONS.**
Subheadings- **Preparation of extracts**

Introduction- It should summarize the rationale, provides a concise research background (not an exhaustive review) and states in single sentence the objective of the study. Please do not include any results or the conclusions of the study.

Materials and methods- All the ethical permission associated in the research work must be specified. It should provide technical information about the study. Published methodological details are not needed to describe that have been published previously. Specifications (including the manufacturer, city, and the country) should be given for the main drugs, chemicals, and instruments. Indicate the statistical methods used and identify statistical significance using superscripts (* and **) following the data (*P < 0.05, **P < 0.01).

Results- It should reveal the findings of works.

Discussion- It should be with the interpretation of the results and their comparison with those of other studies. No need to repeat the results, review literature, textbook knowledge or cite references that do not have a close relationship with the present result.

Conclusions – conclude the study linking back to the aim of the study.

Abbreviations- At the first appearance in the abstract and the text, abbreviations should be preceded by words for which they stand.

Tables- Tables must be concise and cited consecutively using Arabic numerals in the text (table 1, table 2...etc.). The title of the table should clearly indicate the nature of the contents and sufficient detail should be included in the footnote to facilitate interpretation without reference to the text. Use horizontal rules only.

Table Format – It should be designed using table tools of MS Word and exactly same as below

Table 1: It shows ---(12 font size, times new roman, normal, bold)

Groups	Change in body weight (gm)
Control	
Negative control	
Protective	
Curative	

Figures -Figures (photographs, drawings, diagrams and charts) should be clear, easily legible and cited consecutively using Arabic numerals in the text(fig. 1, fig. 2...etc.). Please supply figures 1.5 to 2 times the size at which they will be finally reproduced. For line work, submit black-ink drawings of professional quality. Micrographs or other glossy photographs must be of the highest quality. Use standard symbols: ○, ●, ×, □, ■, △, ▲. Freehand or typewritten lettering is unacceptable. If a figure comprises more than one glossy photograph, these should be marked A, B, C...etc. Figure legends should be marked clearly with their correspond letters. Legends should contain sufficient detail to permit figure interpretation without reference to the text. Scale markers should be indicated in the photographs. Color plates are also welcome. The choice of cover art illustration will be made by the Editor.

Figure format –

Fig. 1: It shows ---(12 Font size, Times New Roman, Normal, Bold)

Manuscripts that fail to conform to the requirements of the Journal, as specified under 'Instructions to Authors', will be rejected outright.

Tables and figures should be cited in the text in numerical order. Table 2 should not be first cited before Table 1.

Units and Symbols - The use of the International System of Units (SI) is recommended.

Physical quantity	Base unit	SI Symbol
Length	Meter	m
Mass	Gram	g
	Kilogram	kg
	Microgram	µg
Time	Second	s
	Minute	min
	Hour	h
	Day	d
	Week	w
	Month	mo
	Year	y
Amount of substance	Mole	mol
Area	square meter	m ²
Volume	cubic meter	m ³
	Liter	l
	Milliliter	ml
	Microliter	µl
	Temperature	°C

Specification	Example	Correct style
Use lowercase for symbols or abbreviations,	Kilogram	kg
Symbols are not followed by a period, exception end of sentence	Meter	m
Do not pluralize symbols	kilograms	kg
When numbers are printed symbols are preferred	100 meters	100 m
Space between number and symbol	2mol 10mg 60°C	2 mol 10 mg 60 °C
Place a zero before a decimal		0.01
Decimal numbers are preferable to fractions		0.75
Space used to separate long number exception four-digit numbers		1 500 000 1000

References

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text (not in alphabetic order). Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parenthesis/bracket like- [1]. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. Use the style of the examples below, which are based on the formats used by the NLM in Index Medicus. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Use complete name of the journal for non-indexed journals. Avoid using abstracts as references. Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as “unpublished observations” with written permission from the source. Avoid citing a “personal communication” unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, contributors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication.

The commonly cited types of references are shown here, for other types of references such as electronic media, newspaper items, etc. please refer to ICMJE Guidelines (<http://www.icmje.org>).

Articles in Journals

1. Devi KV, Pai RS. Antiretrovirals: Need for an Effective Drug Delivery. Indian J Pharm Sci 2006;68:1-6. **List the first six contributors followed by et al.**
2. Volume with supplement: Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. Environ Health Perspect 1994;102 Suppl 1:275-82.
3. Issue with supplement: Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women’s psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996;23(1, Suppl 2):89-97.

Books and Other Monographs

1. Personal author(s): Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

2. Editor(s), compiler(s) as author: Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone;1996.
3. Chapter in a book: Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Short Communication

The journal publishes exciting findings, preliminary data or studies that did not yield enough information to make a full paper as short communications. These have the same format requirements as full papers but are only up to 5 pages in length. Short Communications should not have subtitles such as Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion - all these have to be merged into the running text. Short Communications preferably should have only 3-4 illustrations.

Review Articles

Should be about 18 pages long, contain up-to-date information, comprehensively cover relevant literature and preferably be written by scientists who have in-depth knowledge on the topic. All format requirements are same as those applicable to full papers. Review articles need not be divided into sections such as Materials and Methods and Results and Discussion, but should definitely have an Abstract and Introduction, if necessary.

Conflict of Interest statement

It must be declared by authors.

ANEXO 2

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
E-mail: (55 81) 2126 8842 / 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8358
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 499/12

Recife, 29 de outubro de 2012

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.025194/2012-10

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "*Atividades Biológicas de plantas do mangue Brasileiro*".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério Depto. Fisiologia e Farmacologia da UFPE; Animais: Ratos; Sexo: macho e fêmea; Idade: 8 a 12 semanas; Peso: 225 a 275g; Número de animais previsto no protocolo: 60 animais.

RECEBIDO EM: 06/11/2012
NOME: JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA
ASSINATURA:

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen
Presidente da CEUA

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO 3

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

DESCRIPTION

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

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of indigenous medical knowledge,
- scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The Journal of Ethnopharmacology publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an ethnopharmacological, an ethnobotanical or an ethnochemical approach to the study of indigenous drugs. Reports of anthropological and ethnobotanical field studies fall within the journal's scope. Studies involving pharmacological and toxicological mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

AUDIENCE

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

IMPACT FACTOR

2013: 2.939 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA, BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents/Life Sciences, MEDLINE®, International Pharmaceutical Abstracts, EMBASE, NAPRALERT (Natural Products Alert), Science Citation Index, CAB Abstracts, Scopus, EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: R. Verpoorte, Gorlaeus Lab., HB024, Universiteit Leiden, Einsteinweg 55, 2333 CC, Leiden, Netherlands Deputy Editor-in-Chief A.M. Viljoen, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa Associate Editor: D. Guo, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China A.K. Jäger, University of Copenhagen, Copenhagen O, Denmark G. Lin, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, Hong Kong P.K. Mukherjee, Jadavpur University, Kolkata, India G. Schmeda Hirschmann, Universidad de Talca, Talca, Chile A. Shikov, Saint Petersburg Institute of Pharmacy, Kuzmolovo P 245, Russian Federation E. Yesilada, Yeditepe University, Erenkoy-Istanbul, Turkey Reviews Editor (including Commentaries and Book Reviews): M. Heinrich, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK If you want to suggest a review, please provide a structured abstract and include an annotated table of contents and a short CV of the lead author(s). Managing Editor: B. Pomahacova, Leiden University, Leiden, Netherlands I. Vermaak, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa M. Sandasi, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa Editorial Board: S. Alban, Kiel, Germany M.J. Balick, Bronx, New York, USA R. Bauer G. Bourdy, Cayenne, French Guiana J.B. Calixto, Florianópolis, Brazil C-T. Che, Hong Kong, Hong Kong G.A. Cordell, Evanston, Illinois, USA V.S. da Silva Bolzani, Araraquara, Brazil J. Ding, Shanghai, China V.M. Dirsch, Vienna, Austria T. Efferth, Heidelberg, Germany E. Elisabetsky, Porto Alegre, Brazil J. Fleurentin, Metz, France B.L. Furman, Glasgow, UK M.P. Germano, Messina, Italy J. Gertsch, Bern, Switzerland A.H. Gilani, Karachi, Pakistan M.P. Gupta, Panama City, Panama A. Hensel, Münster, Germany P.J. Houghton, London, UK Z. Ismail, Penang, Malaysia W. Jia, Kannapolis, North Carolina, USA T. Johns, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, Canada A.K. Jäger, Copenhagen O, Denmark G. Kavalali, Istanbul, Turkey H-S. Kim, Cheongju, South Korea J. Kim, Seoul, South Korea Y. Kimura, Ehime, Japan M.A. Lacaille-Dubois, Dijon, France M. Leonti, Cagliari, Italy E. Matteucci, Pisa, Italy I. Merfort, Freiburg, Germany J.J.M. Meyer, Pretoria, South Africa D.E. Moerman D.A. Mulholland, Guildford, England, UK A. Panthong, Chiang Mai, Thailand X. Peigen, Beijing, China A. Pieroni, Pollenzo/Bra, Italy D.D. Soejarto, Chicago, Illinois, USA E. Speroni, Bologna, Italy A.J. Vlietinck, Antwerpen, Belgium H. Wagner, München, Germany C.S. Weckerle, Zurich, Switzerland C.W. Wright, Bradford, UK S. Zacchino, Rosario, Argentina Founding Editors: J.G. Bruhn L. Rivier, Lausanne, Switzerland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

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

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

Classification of your paper

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

The "rules of 5"

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

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

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

Types of paper

The Journal of Ethnopharmacology will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and

references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.

3. Letters to the Editors.

4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author

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

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

7. Conference announcements and news.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Policy and ethics

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

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

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

Author contributions

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

Conflict of interest

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

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see

<http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

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

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

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

Subscription

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

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

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

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

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

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

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

Additional information

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

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

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

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

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

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

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

PREPARATION

Use of word processing software

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

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Glossary

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

Appendices

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

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately

from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

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

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

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Keywords

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

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

Chemical compounds

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

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Plant names In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should

be stated that the plant name has been checked with www.theplantlist.org mentioning the data of accessing that website.

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

Acknowledgements

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

Math formulae

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

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

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

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

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

Color artwork

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

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

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

"Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

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

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

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

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

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

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Video data

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

AudioSlides

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

Supplementary material

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

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See

<http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

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

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

- E-mail address
- Full postal address All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

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

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one

communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>).

Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>.

You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.