



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PALLOMA LIMA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E CITOTÓXICO
DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *Bauhinia
cheilantha* (Bongard) Steude (LEGUMINOSAE)**

Recife
2020

PALLOMA LIMA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E CITOTÓXICO
DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *Bauhinia
cheilantha* (Bongard) Steude (LEGUMINOSAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia química para a saúde

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Ana Christina Brasileiro Vidal

Coorientadoras: Prof^{fa}. Dr^a. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti
Prof^{fa}. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Oliveira, Palloma Lima de

Avaliação do potencial biológico e citotóxico de extratos aquosos de folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steude (Leguminosae) / Palloma Lima de Oliveira – 2020.

94 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal

Coorientadora: Kyria Cilene de Andrade Bortoleti e Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, 2020. Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Plantas medicinais 2. Células de fibroblasto 3. Atividade antioxidante I. Vidal, Ana Christina Brasileiro (orient.) II. Bortoleti, Kyria Cilene de Andrade (coorient.) III. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) IV. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-242

PALLOMA LIMA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E CITOTÓXICO
DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *Bauhinia
cheilantha* (Bongard) Steude (LEGUMINOSAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia química
para a saúde

Aprovada em: 31/08/2020

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Ana Christina Brasileiro-Vidal
Departamento de Genética - Centro de Biociências/UFPE
(Orientadora)

Dr. Pedro Marcos de Almeida (Titular externo)
Departamento de Genética - Centro de Ciências da Saúde/ UESPI

Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar (Titular interno)
Departamento de Antibióticos - Centro de Biociências/UFPE

A Deus;

Aos meus queridos pais, Paulo (*in memoriam*) e Maria Lúcia, pelo exemplo de vida e
por serem os melhores pais que eu poderia ter;

Aos meus irmãos, Charles e Gleydson, por todo apoio, carinho, atenção e união,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me dar o dom da vida, por guiar meus passos, não me deixar cair e nem me abalar pelas pedras encontradas no meu caminho. Por ter me concedido sabedoria para seguir em frente, e por ter guiado meus passos nessa trajetória.

Especialmente aos meus amados Pais, **Paulo Xavier de Oliveira** (*in memoriam*) e **Maria Lúcia de Lima Oliveira**, por toda dedicação e apoio que me deram na busca dos meus objetivos, e por estarem sempre do meu lado. Tudo que sou hoje é resultado da educação que vocês me proporcionaram.

Aos meus irmãos **Charles de Lima Oliveira** e **Gleydson Lima de Oliveira**, por estarem ao meu lado, por incentivarem meus sonhos e por sempre estenderem a mão quando precisei. À minha cunhada **Maria das Graças**, por estar sempre por perto e me presentear com meu sobrinho **Luan**, meu eterno príncipe, amor da minha vida. Amo vocês.

Aos meus avós, **Joaquim João de Lima** (*in memoriam*), **Maria Cândida de Lima** (*in memoriam*), **Ubaldo Xavier de Oliveira** (*in memoriam*) e **Joana Barbosa de Oliveira**, por mostrarem que a base da família é o amor, união, que a humildade é fundamental e que não importa o que aconteça na vida, o sorriso no rosto e o brilho no olhar não podem faltar. “Se estamos juntos tudo conquistamos”

Agradeço a minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Ana Christina Brasileiro-Vidal**, por todos os ensinamentos, pelo tempo dedicado! Obrigada por me oferecer as ferramentas necessárias para que eu pudesse ir em busca de mais esta conquista. O seu comprometimento, dedicação e disponibilidade me ensinaram muito. Tenha minha eterna gratidão.

Um agradecimento todo especial a minha querida, coorientadora e amiga **Prof^a. Dr^a. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti**. Para você Prof^a., guardo os meus melhores sentimentos. Tenho uma gratidão imensurável por ti. Agradeço pela cobrança em sempre me exigir o melhor, por saber sempre tirar o meu melhor também. Por acreditar na minha capacidade, por abrir portas, mostrar o caminho e direcionar meus passos com retidão para ajudar a conquistar meus objetivos. Tenho em você um

exemplo de mulher forte, honesta, inteligente e muito dedicada ao trabalho. Espelho de como eu quero ser profissionalmente. Sempre serás a minha Prof^a. querida, morarás eternamente em meu coração. Gratidão eterna.

Agradeço à coorientação da **Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva**, pelos ensinamentos passados nas reuniões, bem como sempre deixar transparecer o amor pela Caatinga. Estendo meu agradecimento também por ceder a infraestrutura do Laboratório de Recursos Naturais – Departamento de bioquímica. Sua simplicidade e amor pelo trabalho são verdadeiras inspiração.

Agradeço à **Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon** por dispor o Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal para a realização dos experimentos, bem como à **Prof^a. Dr^a. Neide Santos** por ceder o Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana para execução dos experimentos de cultura de células. A alegria de vocês contagia todo mundo.

Aos meus **tios, tias e primos**, por todo cuidado e preocupação; família é a base de tudo e sou eternamente grata por todo apoio de vocês nessa trajetória. Peço desculpas por minha ausência em muitas comemorações. Amo vocês.

Agradeço à **Tia Ana Rosa** e **Carlos Alberto**! A família que ganhei quando morei em Recife! Agradeço pelos momentos descontraídos nos finais de semana, que me oxigenavam e me faziam sair da rotina pesada...e, ao meu pequeno **Walbinho**, que é uma preciosidade em meu caminho, um amor puro. O brilho do teu olhar sempre me fizera sorrir, te amo muito!

À minha querida amiga **Núbia Coelho de Amorim**, pelo apoio e companheirismo nessa caminhada. Esteve ao meu lado em todos os momentos, ficando feliz com as minhas conquistas. E a **Gregório Magno**, por toda amizade e carinho. Vocês dois foram e são fundamentais na minha vida, sempre presentes na minha caminhada. Deus continue abençoando vocês!

Ao **Prof. Dr. Draulio Costa da Silva**, pela disponibilidade nas discussões de protocolos e por ceder o laboratório de bioquímica para preparação dos extratos, bem como à **Matheus Eufrazio do Nascimento** pela ajuda na preparação do material. Muito Obrigada!

Agradeço, especialmente, aos meus amigos, **José Rafael da Silva Araújo** e **Camila Marinho da Silva** pelo auxílio direta na execução dos experimentos, pelas conversas, compartilhamento de experiências e pela amizade; e, pelas discussões de artigos, conhecimentos compartilhados. Fica meu eterno agradecimento pelo carinho e amizade. Contem sempre comigo!

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes, e nunca deixaram de compreender os momentos em que não foi possível encontrá-los.

À **Dr^a Silvany de Sousa Araújo** (*in memoriam*) pelo treinamento de cultivo celular, bem como por ceder as células para a execução dos experimentos citogenotóxicos.

Ao pessoal do laboratório LBGV, de forma especial **Joseane, Rafaela, Sibelle, Thamara** e **Vanessa**, pelo convívio e cada ajuda que porventura precisei.

À **FACEPE** (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pelo suporte financeiro ao desenvolvimento desta pesquisa (Edital 21/2018 - “concessão de Bolsas de Pós-Graduação stricto sensu (1º semestre/2019)”).

À coordenação e à secretaria do **PPGCB** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), em nome da atual coordenadora **Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva** e secretária **Adenilda Eugênia de Lima**, bem como ao corpo docente, por terem contribuído para a conclusão dessa importante etapa da minha formação.

E, por fim, a **Universidade Federal de Pernambuco**, seu corpo docente e administrativo, os quais possibilitaram o alcance deste título.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente
você estará fazendo o impossível”.

(São Francisco de Assis)

RESUMO

Bauhinia cheilantha (Bong.) Steud. (Leguminosae), conhecida como pata-de-vaca ou mororó, é uma planta típica da Caatinga utilizada na medicina popular por suas propriedades antidiabética, anti-inflamatória e sedativa. O presente estudo avaliou a composição fitoquímica, a atividade antioxidante e o potencial citotóxico de extratos aquosos foliares de *B. cheilantha* (não delipidado e delipidado), mediante cromatografia em camada delgada, testes bioquímicos de DPPH (1,56 a 200 µg/mL), ABTS (3,12 a 50,0 µg/mL) e fosfomolibdênio (12,5 a 100 µg/mL) e ensaio de MTT utilizando a linhagem celular de fibroblasto L929 (1,56 a 1.600 µg/mL), respectivamente. Ambos os extratos apresentaram os metabólitos secundários derivados antracênicos, saponinas e compostos fenólicos, incluindo antocianinas, ligninas e taninos hidrolisáveis. Adicionalmente, os extratos de *B. cheilantha* apresentaram efeitos antioxidantes dose-dependentes. No DPPH, o não delipidado e o delipidado mostraram EC₅₀ de 25,84 e 26,19 µg/mL, respectivamente; no ensaio do ABTS, o EC₅₀ foi de 13,60 (não delipidado) e 16,34 µg/mL (delipidado), enquanto no teste de fosfomolibdênio, observou-se EC₅₀ de 66,09 (não delipidado) e 52,78 µg/mL (delipidado). No que tange à citotoxicidade, o extrato não delipidado apresentou ausência de citotoxicidade para todas as concentrações testadas, exceto para a mais alta de 1.600 µg/mL, enquanto o extrato delipidado mostrou efeito citotóxico apenas para as duas maiores concentrações 800 e 1.600 µg/mL. Os dados obtidos demonstraram que os extratos foliares de *B. cheilantha* possuem potencial antioxidante promissor para tratamentos de doenças causadas por radicais livres, com ausência de citotoxicidade para as concentrações antioxidantes sugeridas, confirmando o seu potencial como fonte natural de recursos terapêuticos.

Palavras-chave: Antioxidante. Células de fibroblasto. L929. MTT. Planta Medicinal. Pata-de-vaca

ABSTRACT

Bauhinia cheilantha (Bong.) Steud. (Leguminosae), commonly known as pata-de-vaca or mororó, is a typical plant of Caatinga, used in popular medicine, due to its antidiabetic, anti-inflammatory and sedative properties. The present study evaluated the phytochemical composition, antioxidant activity and cytotoxic potential of two aqueous leaf extracts of *B. cheilantha* (not delipidated or delipidated), using thin layer chromatography, biochemical tests of DPPH (1,56 to 200 µg/mL), ABTS (3,12 to 50,0 µg/mL) and phosphomolybdenum (12,5 to 100 µg/mL), and MTT assay on L929 fibroblast cells (1,56 to 1.600 µg/mL), respectively. Both extracts showed secondary metabolites, including anthracene derivatives, saponins, and phenolic compounds, such as anthocyanins, lignins, and hydrolysable tannins. Additionally, *B. cheilantha* extracts showed dose-dependent antioxidant effects. In DPPH method, non-delipidated and delipidated showed EC₅₀ of 25.84 and 26.19 µg/mL, respectively; in the ABTS, the EC₅₀ was 13.60 (non-delipidated) and 16.34 µg/mL (delipidated), while in the phosphomolybdenum test, EC₅₀ of 66.09 (non-delipidated) and 52.78 µg/mL (delipidated), were observed. Furthermore, non-delipidated showed absence of cytotoxicity for all tested concentrations, except for the highest concentration of 1,600 µg/mL, while delipidated extract presented cytotoxic effect only for the two highest concentrations 800 and 1,600 µg/mL. Our data demonstrated that both leaf extracts of *B. cheilantha* have promising antioxidant potential for the treatment of diseases influenced and/or caused by free radicals, with absence of cytotoxicity to the suggested antioxidant concentrations, confirming its potential as a natural source of therapeutic resources.

Keywords: Antioxidant. Fibroblast cell. L929. Medicinal plant. MTT. Pata-de-vaca.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 01** - Frutos da família Leguminosae do tipo legume: a. bacoide; b. nucoide; e c. folículo. Fonte: Córdula; Morim; Alves (2014), com algumas adaptações..... 22
- Figura 02** - Representantes do gênero *Bauhinia* com variação na coloração das pétalas. A. *B. divaricata*; B. *B. erythrocalyx*; C. *B. herrerae*; D. *B. unguolata*; E. *B. variegata*; F. *B. jenningsii*. Fonte: Torres-Colín; Duno De Stefano; Lorena Can (2009), com algumas adaptações... 24
- Figura 03** - Espécie *Bauhinia cheilantha* 26
- Figura 04** - Reação do teste de DPPH. O radical DPPH (coloração roxa) sofre uma redução mediante contato com um extrato vegetal com potencial antioxidante, transformando-se em DPPH-H (coloração amarela). Fonte: Pires et al. (2017), com algumas adaptações 35
- Figura 05** - Reação da redução do ABTS+ [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio Fonte: Rufino et al. (2007) 36
- Figura 06** - Estrutura química do MTT no processo de clivagem na mitocôndria em células viáveis. Fonte: Ebada et al. (2008) 39

ARTIGO I: Extrato aquoso foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steude (Leguminosae): antioxidante natural não citotóxico

- Figura 01** - Avaliação da viabilidade celular em linhagem de fibroblasto L929 de camundongo mediante o ensaio de MTT em diferentes concentrações dos extratos aquosos foliares de *B. cheilantha*. (A) sem o processo de delipidação, e (B) submetido à delipidação. Os valores correspondem à média e as barras ao desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular. CN: Controle Negativo (meio de cultura); CP: controle positivo (Triton-X 100 a 1,5%) 66

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 01 - Atividades biológicas descritas para estruturas vegetais de espécies pertencentes ao gênero <i>Bauhinia</i>	25
--	----

Tabela 02 - Compostos químicos e suas respectivas classes encontrados em representantes do gênero <i>Bauhinia</i>	30
--	----

ARTIGO I: Extrato aquoso foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steude (Leguminosae): antioxidante natural não citotóxico

Tabela 01 - Sistemas eluentes e reveladores utilizados para análise do perfil fitoquímico dos extratos aquosos foliares de <i>Bauhinia cheilantha</i> .	61
--	----

Tabela 02 - Efeito oxidante <i>in vitro</i> dos extratos aquosos foliares de <i>Bauhinia cheilantha</i> com e sem o processo de delipidação, expressado pela EC ₅₀	65
--	----

LISTA DE SIGLAS

ABTS	[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] [2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico)]
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
BER	<i>Base Excision Repair</i> Reparo por excisão de bases
C	Carbono
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC ₅₀	Concentração efetiva
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Administração de Alimentos e Medicamentos
GPx	Glutationa peroxidase
GST	Glutationa transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HVASF	Herbário Vale do São Francisco
IPP	Isopentenilpírofosfato
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio
NFκB	<i>Nuclear Fator kappa-B</i> Fator Nuclear kappa-B
O ₂ ⁻	Ânion-radical superóxido
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRx	Peroxiredoxina
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Enzima superóxido dismutase
TRX	Tioredoxina
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	PLANTAS MEDICINAIS E SEUS EFEITOS FITOTERÁPICOS	19
3.2	LEGUMINOSAE Juss (Fabaceae L.)	21
3.3	GÊNERO <i>Bauhinia</i> L.: ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	23
3.4	A ESPÉCIE <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud	25
3.5	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	27
3.6	RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES DAS PLANTAS MEDICINAIS	32
3.6.1	Testes bioquímicos para avaliação do potencial antioxidante	34
3.7	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE FITOCONSTITUINTES PRESENTES EM PLANTAS MEDICINAIS	37
	REFERÊNCIAS	41
4	ARTIGO I - Extrato aquoso foliar de <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bongard) Steude (Leguminosae): antioxidante natural não citotóxico	56
5	CONCLUSÕES	69
	ANEXO A - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	76

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são comumente empregadas na medicina popular para fins de prevenção e tratamento de doenças (FRANÇA et al., 2008; RIBEIRO, 2017). Seu uso é justificado pela diversidade de metabólitos ativos presente nas plantas, os quais podem atuar de forma sinérgica e/ou antagônica, incluindo propriedades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, entre outras (LIYANAARACHCHI et al., 2018; RASOOL HASSAN, 2012).

Diversos estudos têm sido realizados para comprovar a potencialidade das plantas medicinais de diferentes ecossistemas (VASCONCELOS et al., 2007). Contudo, alguns biomas, como a Caatinga, apresentam escassez de estudos científicos quanto às propriedades da sua flora (LEAL; TABARELI; SILVA, 2003; LESSA et al., 2019). Entre os representantes da Caatinga, espécies do gênero *Bauhinia* L. (Leguminosae) têm sido apontadas por diferentes potenciais biológicos como: *B. holophylla* (Bong.) Steud., potente sorotipo 2 do vírus da dengue; *B. purpurea* Linn, atividade anti-úlceras; *B. racemosa* Lam., atividades antioxidante e antimicrobiana; *B. forficata* Link, potencial fungicida sobre o fungo *Candida albicans*, e *B. splendens* Kunth, ação analgésica (FILHO et al., 1997; OLIVEIRA; LIMA, 2017; RASHED; BUTNARIU, 2014; SANTOS et al., 2019; ZAKARIA et al., 2011).

As folhas, casca do caule e entrecasca de *Bauhinia* são bastante utilizadas em vários tipos de preparações na medicina tradicional, principalmente na forma de chá, mas também como lambedor, tintura e *in natura*. A depender da espécie e parte da planta, as preparações têm sido indicadas para o tratamento de tosse, cefaleia, inflamação, dor de garganta, febre, mal-estar, fadiga, edemas, dores no corpo em geral, anticoagulante, problemas cardíacos, pressão alta, derrame, infecção urinária, cólicas, calculose renal, cicatrização, colesterol, anemia, tuberculose, câncer ou tumores (ALBERGARIA; SILVA; SILVA, 2019; NOGUEIRA; SABINO, 2013).

O uso popular de espécies de *Bauhinia* tem estimulado estudos quanto ao seu potencial, eficiência e segurança de uso (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). Entre os primeiros testes que devem ser realizados para validar a segurança de fitoquímicos para uso medicinal, destacam-se as análises de citotoxicidade, as quais sugerem doses para estudos pré-clínicos (ARAÚJO et al., 2015), recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em *Bauhinia*, análises da citotoxicidade e genotoxicidade foram reportadas para *B.*

forficata (BRESOLIN; FERRÃO VARGAS, 1993), *B. galpinii* N.E.Br. (VERSCHAEVE; VAN STADEN, 2008), *B. holophylla* (Bong.) Steud (RIBEIRO et al., 2018), *B. monandra* Kurz. (MACÊDO et al., 2008) e *B. platypetala* (Burch. ex Benth.) (SANTOS et al., 2012).

Contudo, há poucos estudos quanto a atividades biológicas de *B. cheilantha* (Bongard) Steude, conhecida popularmente como pata-de-vaca ou mororó (SILVA et al., 2017). Esta é uma espécie de importância ecológica, econômico e social; explorada por seu valor ornamental, por auxiliar no controle de erosão e suas folhas serem utilizadas para forragem devido ao elevado valor proteico (CAMPANHA; ARAÚJO, 2010). Adicionalmente, o extrato etanólico foliar de *B. cheilantha* apresentou capacidade antioxidante pelo método 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), provavelmente relacionada à presença de compostos fenólicos totais e de flavonoides (SILVA et al., 2017). Entretanto, para *B. cheilantha*, não há estudos relativos ao potencial antioxidante nem citogenotóxico de extratos foliares aquosos ou de infusões, modo de preparo comumente utilizado na medicina popular (ANDRADE et al., 2010; BIRBEN et al., 2012).

A composição de metabólitos secundários previamente relatada para o extrato etanólico foliar de *B. cheilantha* e o uso empírico de infusões de suas folhas na medicina tradicional sugerem seu potencial para a geração de produtos farmacológicos, tornando-se necessário avaliar as atividades biológicas, bem como os possíveis efeitos adversos do uso desse vegetal. Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar o potencial antioxidante do extrato aquoso foliar de *B. cheilantha*, bem como sugerir concentrações de extratos aquosos foliares desse vegetal para estudos pré-clínicos mediante a investigação dos seus potenciais citotóxicos sobre a cultura de células de fibroblasto da linhagem L929.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o potencial antioxidante e citotóxico de extratos aquosos foliares de *Bauhinia cheilantha*, mediante a aplicação de testes antioxidantes e cultura celular da linhagem L929.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar o perfil fitoquímico de extratos aquosos foliares de *B. cheilantha*.
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante de extratos aquosos foliares de *B. cheilantha* mediante os testes de DPP, ABTS e fosfomolibdênio.
- ✓ Analisar a citotoxicidade de extratos aquosos das folhas de *B. cheilantha*, utilizando o teste de viabilidade celular MTT em cultura de células de fibroblastos.
- ✓ Definir concentrações para testes *in vitro* pré-clínicos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS E SEUS EFEITOS FITOTERÁPICOS

As plantas medicinais, nativas ou cultivadas, podem ser utilizadas para fins terapêuticos no estado fresco ou seco (PAULA ALVES et al., 2018). Em muitas comunidades, principalmente nos países em desenvolvimento e em regiões de difícil acesso à saúde pública, o uso das plantas medicinais é considerado uma prática comum para fins terapêuticos desde a antiguidade (MACIEL et al., 2002). Os relatos de uso dessas plantas estão descritos desde o quarto século a. C. (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) mediante conhecimentos empíricos (PAULA ALVES et al., 2018), sendo utilizadas sementes, raízes, folhas, frutas, casca, flores ou até mesmo a planta inteira, na forma chá, sucos ou alimentos (BRANCO, 2019).

As estruturas vegetais apresentam um ou mais compostos químicos ativos, que podem atuar alterando sistemas enzimáticos e/ou processos fisiológicos (SOUZA et al., 2017). Tais fitoquímicos são capazes de agir de forma: sinérgica, potencializando os efeitos individuais de cada metabólito; antagônica, diminuindo os efeitos de um ou até de todos os metabólitos presentes, ou aditiva, mediante o somatório de efeitos dos metabólitos. Podem influenciar na absorção de um dado composto, mostrando efeitos diretos ou indiretos no tratamento terapêutico (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

As interações podem ser consideradas positivas, quando elevam o efeito e a resposta terapêutica, bem como quando diminuem ou anulam os efeitos tóxicos; ou negativas, podendo propiciar o surgimento de novas doenças, aumentar a toxicidade e reduzir ou inativar possíveis efeitos terapêuticos (BRANCO, 2019). O citrônolol, por exemplo, é um composto presente no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (erva cidreira), que potencializa a ação anti-hipertensiva de medicamentos como Nitroprussiato e Minoxidil (vasodilatadores), indicando uma ação positiva e sinérgica (RASOOL HASSAN, 2012; SOUZA et al., 2017). Em contrapartida, o uso constante da combinação de *Ginkgo biloba* L. e Nifedipina (bloqueador de canais de cálcio), visando ao aumento de uma ação anti-hipertensiva, apresentou uma atividade antagônica, observando-se o aparecimento de reações adversas como dores de cabeça e inchaço no tornozelo (TEIXEIRA; SANTOS, 2011).

Em nível mundial, estima-se que cerca de 500.000 plantas apresentam alguma propriedade medicinal, embora a maioria não tenha sido estudada cientificamente, ressaltando-se a importância de estudos em relação às suas atividades fitoterápicas e aplicação no tratamento de diversas doenças (SINGH, 2015). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 21.000 espécies vegetais são utilizadas para o tratamento de alguma enfermidade. Ao longo dos anos, os produtos oriundos de plantas medicinais têm aumentado em esfera mundial, como observado em países do Oriente Médio, América Latina, África e Ásia, onde 85% da população faz uso da medicina tradicional. Tal fato interfere no mercado econômico, em termos de comercialização das plantas *in natura* e/ou dos seus produtos farmacológicos. Estima-se o aumento do faturamento com as ervas medicinais, salientando-se a Ásia-Pacífico e Europa como as regiões de maiores mercados em crescimento. Paralelamente, estudos apontam que os chineses aumentaram em 20% as compras de fitoterápicos em 2012, quando comparado com o ano de 2011 (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). No Brasil, o faturamento do ramo farmacêutico de fitoterápicos é estimado em 25% (SOUZA et al., 2019).

Na indústria farmacêutica, a exploração de plantas medicinais está diretamente relacionada à sua riqueza de compostos, possibilitando a síntese de novos produtos. Estudos demonstram que 50 a 77% dos medicamentos são derivados de algum composto de origem vegetal, como: a aspirina, extraída da casca de *Salix alba* L., o salgueiro-branco; digoxigenina, extraído de *Digitalis purpurea* L., a dedaleira; morfina, obtido de *Papaver somniferum* L., a papoula do ópio; quinina, extraído de *Cinchona officinalis* L., a cinchona; pilocarpine, obtido de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm., o maranhão jaborandi, entre outros (ASLAM; AHMAD, 2016; HARVEY, 2008).

Apesar da constante utilização dos fitoterápicos como atenção primária à saúde humana, há muitas preocupações voltadas para a eficiência e a segurança do uso indiscriminado de algumas plantas (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). Na tentativa de validação do uso das plantas medicinais com segurança, algumas ações podem ser destacadas. No Brasil, em 2007, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, destacando-se a proposta de “promover e reconhecer os interesses populares e práticas tradicionais de uso de plantas medicinais, fitoterápicas e remédios caseiros” (ALBUQUERQUE; ALVES, 2016; BRASIL, 2016).

Em 2009, o Ministério da Saúde lançou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), destacando 71 espécies de plantas medicinais que são utilizadas por conhecimento empírico e tiveram suas atividades comprovadas cientificamente, a exemplo do alho (*Allium sativum* L. (alho), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), alfavaca brava (*Ocimum gratissimum* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae* var. *paulensis* Toledo), unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) DC.], e três espécies de pata-de-vaca (*Bauhinia affinis* Vogel, *B. forficata* e *Bauhinia variegata* L.) (BRASIL, 2020).

3.2 LEGUMINOSAE Juss. (Fabaceae L.)

A família Leguminosae, pertencente a ordem Fabales e classe Magnoliopsida, destaca-se por ser a terceira maior família das Angiospermas. Atualmente, com base em trabalhos prévios e em análises filogenéticas utilizando marcadores moleculares cloroplastidiais *matK*, está subdividida em seis subfamílias: Duparquetioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae (com a antiga subfamília Mimosoidae incluída) e Papilionoideae, englobando cerca de 750 gêneros e aproximadamente 19.500 espécies (LPWG, 2013; 2017). Apresenta uma ampla distribuição mundial, exibindo uma boa capacidade de adaptação (RODRIGUES et al., 2020).

No Brasil, cerca de 220 gêneros e 2.830 espécies estão distribuídos em todos os biomas, com predominância na Amazônia e Caatinga (GIULIETTI et al., 2005; PEREIRA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020; SILVA; OLIVEIRA, 2015). Cerca de 170 gêneros e de 1.080 espécies representativas das leguminosas ocorrem em todos os Estados do Nordeste brasileiro. No bioma Caatinga, destacam-se cerca 130 gêneros e 590 espécies, sendo 149 consideradas endêmicas (FERREIRA; TROVÃO; MELO, 2015).

A família inclui árvores, arbustos, lianas e ervas (SILVEIRA; MIOTTO, 2013), notando-se uma grande diversidade morfológica, a exemplo das árvores *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Basil) e *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth (jacarandá-da-Bahia), do arbusto *Calliandra tweediei* Benth (topete-de-cardeal) ou mesmo da *Neptunia oleracea* Lour. (sensitiva-de-água), uma planta aquática (SILVEIRA; MIOTTO, 2013). Seus representantes são caracterizados por possuir folhas

compostas, trifolíares ou pinadas, as quais podem mostrar estípulas passíveis de se transformar em espinhos. Além disso, as folhas podem conter em sua base uma estrutura chamada pulvino que proporciona uma maior mobilidade. Quanto à inflorescência, é frequentemente racemosa, com flores vistosas de simetria radial, presença do cálice e corola pentâmeros e, normalmente, bissexuadas. Os frutos também são variados, mas geralmente são do tipo legumes (vagens), podendo observar legume tipo bacoide, nucoide ou folículo (Figura 1) (FERNANDES; GARCIA, 2008).

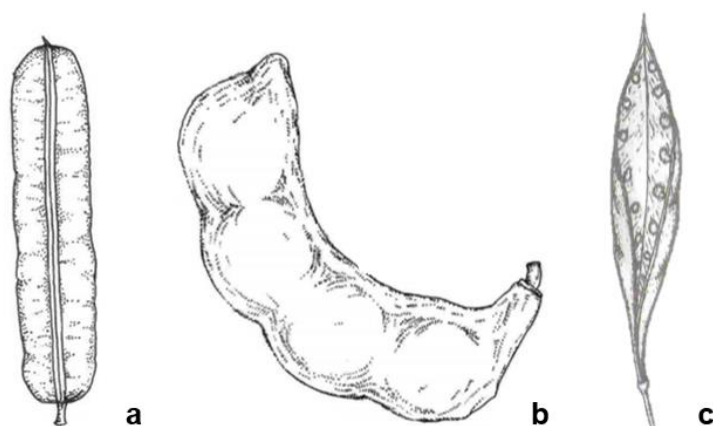


Figura 1 - Frutos da família Leguminosae do tipo legume: **a.** bacoide; **b.** nucoide; e **c.** folículo. Fonte: Córdula; Morim; Alves (2014), com algumas adaptações.

Muitas leguminosas apresentam grande importância econômica, ecológica e social, destacando-se espécies utilizadas para: arborização, como *B. variegata* (pata-de-vaca), *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), *Acacia bonariensis* Gillies ex Hook. & Arn. (unha-de-gato) e *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard (sombreiro); na indústria madeireira, como *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (jacarandá-da-bahia), *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira), *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (amburana-de-cheiro); na indústria alimentícia, tais como *Arachis hypogaea* L. (amendoim), *Ceratonia siliqua* L. (alfarrobeira) e *Pisum sativum* L. (ervilha), e na medicina popular, como *Anadenanthera colubrina* (Vell.) (angico-branco), *Myroxylon peruiferum* L. f. (bálsamo), *Bauhinia radiata* Vell (pata-de-vaca) e *Bauhinia vahlii* Wight & Arn (pata-de-vaca) (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; PEREIRA et al., 2019).

3.3 GÊNERO *Bauhinia* L.: ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O gênero *Bauhinia* (Linnaeus, 1753), pertencente à subfamília Cercidoidae (LPWG, 2017), é composto por aproximadamente 500 espécies entre arbustos e pequenas árvores, presentes nos continentes da América do Sul, África e Ásia (SINOUE et al., 2009). No Brasil, o gênero possui cerca de 300 espécies, dentre as quais 200 são descritas como nativas, distribuídas em todo Nordeste brasileiro, Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) (SIMÕES; ALMEIDA, 2015).

As espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia* são facilmente diferenciadas dos demais representantes da subfamília por terem como característica marcante folhas inteiras, medindo de 7-12 cm quando adulta, alternas e bilobadas. Tal morfologia embasa o nome popular de suas espécies, as quais são denominadas “pata-de-vaca” ou “unha-de-boi”. Apresentam porte arbóreo médio ou arbustivo, sendo utilizadas para recuperar áreas degradadas e para ornamentação (SILVA-LÓPEZ; SANTOS, 2015).

As flores apresentam em geral o cálice espatáceo, cinco pétalas unguiculadas, cuja coloração varia entre vermelho, branco, violeta, rosa e amarelo (Figura 2). O número de estames pode variar de um a 10 nas diferentes espécies; as gavinhas são ausentes; os frutos são legumes ou vagens achatados, e as sementes têm lóbulos com arilo curto e rosca subapical, com coloração de castanho a preta (RAMÍREZ-DE ANDA; COLÍN, 2007; SILVA et al., 2016; TORRES-COLÍN; DUNO DE STEFANO; LORENA CAN, 2009). As sementes apresentam dormência associada à presença de tegumento resistente e impermeável, o qual possibilita um bloqueio físico, resultando na dificuldade da passagem de água e as trocas gasosas e, conseqüentemente, no retardo do processo germinativo (MARTINELLI-SENEME et al., 2006).

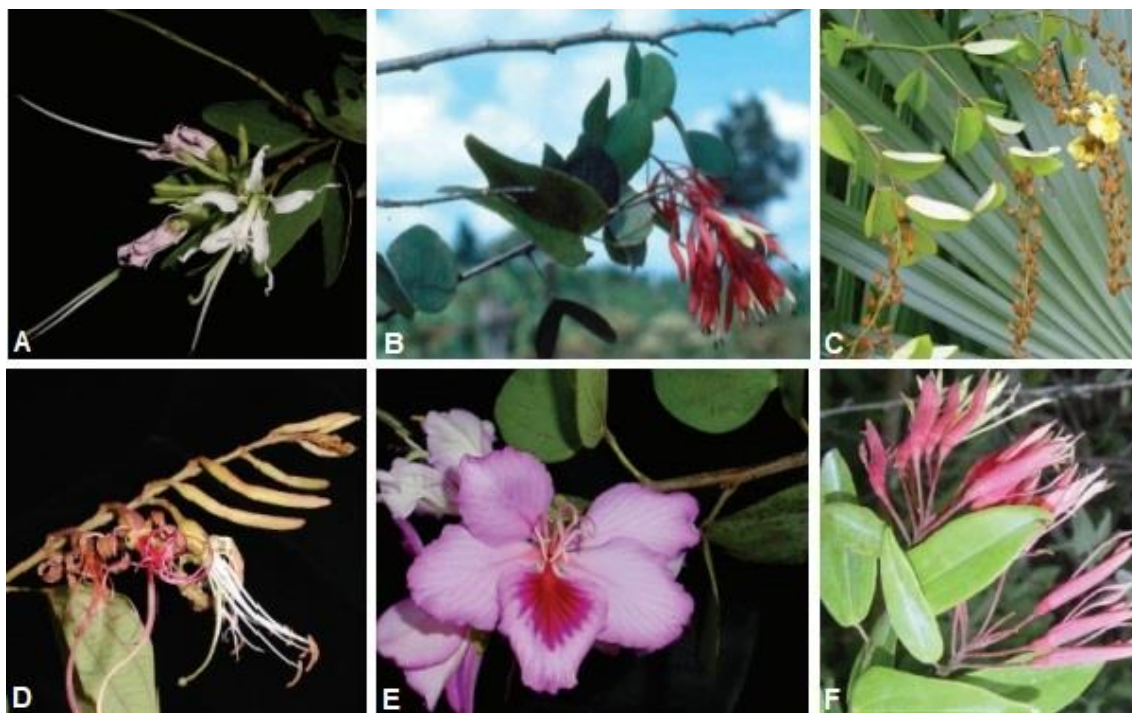


Figura 2 - Representantes do gênero *Bauhinia* com variação na coloração das pétalas. **A.** *B. divaricata*; **B.** *B. erythrocalyx*; **C.** *B. herrerae*; **D.** *B. unguolata*; **E.** *B. variegata*; **F.** *B. jenningsii*. Fonte: Torres-Colín; Duno De Stefano; Lorena Can (2009), com algumas adaptações.

As folhas, caule e raízes das patas-de-vaca são bastante utilizadas pela medicina popular, devido as suas atividades anti-inflamatória, antidiabética, antifúngica, antiparasitária, antioxidante e processos dolorosos (ALIYU et al., 2009; BOONPHONG et al., 2007; DAS; JAGANNATH; DINDA, 2012). Silva et al. (2010) realizaram um levantamento das plantas medicinais mais utilizadas para o tratamento de anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas em uma população no estado de Mato Grosso, observando-se que cerca de 95,6% dos entrevistados usavam plantas medicinais, principalmente leguminosas. Entre elas, foi citada a espécie *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud., cujas folhas eram utilizadas pelo método de infusão.

Atualmente, algumas atividades biológicas já foram descritas para representantes do gênero *Bauhinia* (Tabela 1), dentre elas *B. forficata*, *B. variegata*, *B. splendens*, *B. manca*, *B. rufescens*, *B. rufa*, *B. monandra*, *B. holophylla* e *B. smiliciana* (GONZALEZ-MUJICA et al., 2003; SILVA et al., 2002). Tais atividades foram associadas à presença dos principais metabólitos secundários encontrados em estudos fitoquímicos, como os flavonoides, triterpenoides e glicosídeos esteroidais (FORTUNATO, 1986).

Tabela 1 - Atividades biológicas descritas para estruturas vegetais de espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia*.

Espécie	Estrutura vegetal	Atividade biológica	Referências
<i>B. forficata</i>	Folha	Mutagênica	Bresolin; Ferrão Vargas (1993)
<i>B. galpinii</i>	Folha	Genotóxica e antigenotóxica	Verschaeve; Van Staden (2008)
<i>B. guianensis</i>	Casca de caule	Anti-inflamatória e analgésica	Carvalho et al. (1999)
<i>B. holophylla</i>	Folha	Citotóxica, mutagênica e antimutagênica	Ribeiro et al. (2018)
<i>B. monandra</i>	Folha	Citotóxica, mutagênica e genotóxica	Macêdo et al. (2008)
<i>B. platypetala</i>	Folha	Citotóxica, mutagênica e genotóxica	Santos et al. (2012)
<i>B. purpurea</i>	Folha, raiz, casca de caule	Antimalárica, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana, antiulcerogênica e citotóxica	Annegowda et al. (2012); Boonphong et al. (2007); Chaudhari; Joshi; Mistry (2013); Shreedhara et al., 2009; Zakaria et al. (2011)
<i>B. vahlii</i>	Planta inteira	Anti-inflamatória e antidiabética	Das; Jagannath; Dinda (2012)
<i>B. variegata</i>	Folha, casca do caule	Anti-inflamatória, antimicrobiano, genotóxico	Dhale (2011); Pandey; Agrawal (2010); Saha et al. (2011)
<i>B. racemosa</i>	Casca do caule, folha, parte aérea	Anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antipirética, antidiabética, antiadipogênica, hipolipemiante, citotóxica e apoptótica	Gupta et al. (2005); Kumar et al. (2005); Kumar et al. (2017); Rahman; Akhtar; Arshad (2016); Rashed; Butnariu (2014)
<i>B. rufescens</i>	Folha	Antioxidante	Aliyu et al. (2009)

3.4 A ESPÉCIE *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud

Bauhinia cheilantha, conhecida popularmente como pata-de-vaca ou mororó, é uma espécie endêmica da Caatinga, ocorrendo em diversos estados brasileiros como nos Estados da Região Nordeste, no Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo (AMORIM; SAMPAIO; ARAÚJO, 2005; FERRAZ et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2007). Considerada uma pequena árvore que pode chegar até cerca de 6 m de altura, apresenta folhas bilobadas, flores em cachos com pétalas brancas e antese noturna (Figura 3) (DA FONSECA VAZ; AZEVEDO TOZZI, 2003).



Figura 3 - Espécie *Bauhinia cheilantha*. Fonte: Autor.

Durante o período de estiagem, as folhas de *B. cheilantha* permanecem verdes por mais tempo, quando comparadas a outras plantas do semiárido, tornando-se um dos poucos recursos disponíveis para fonte de alimentação animal (MOREIRA et al., 2006), sendo usada em aproximadamente 20 % da dieta dos rebanhos bovinos no Nordeste brasileiro (DO NASCIMENTO et al., 2014; SANTANA et al., 2011). Contudo, estudos realizados com taninos condensados presentes nas folhas de *B. cheilantha* demonstraram uma ação inibitória em relação ao crescimento e à atividade enzimática da bactéria celulolítica ruminal (*Ruminococcus flavifaciens*), possibilitando perdas nutricionais àqueles ruminantes que têm a *B. cheilantha* como fonte alimentar (GUIMARÃES-BEELEN et al., 2006). Adicionalmente, suas sementes contêm alto teor de proteínas, presença de aminoácidos essenciais, baixos níveis de compostos antinutricionais, bem como parâmetros de qualidade de proteínas comparáveis aos de leguminosas utilizadas na alimentação, como soja e feijão-caupi (TEIXEIRA et al., 2013).

Bauhinia cheilantha é comumente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. É consumida geralmente na forma de infusão por diversas comunidades tradicionais como as do semiárido nordestino brasileiro (CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010; TEIXEIRA et al., 2013). Tem sido reportado que o extrato etanólico foliar de *B. cheilantha* apresenta comprovadas propriedades antidiabética, anti-reumatismo, anti-inflamatória e

sedativa (ALMEIDA et al., 2005; ALVES MARTINS et al., 2015). Do ponto de vista fitoquímico, os extratos etanólicos de *B. cheilantha* apresentaram diferentes classes de compostos de interesse medicinal, como flavononas (caule, raiz), flavonas, flavonoides, xantonas (folhas, casca e raízes), fenóis (caule, folha), alcaloides, antraquinonas e esteroides livres (LUNA et al., 2005).

O óleo essencial das folhas de *B. cheilantha* apresentou ação anti-tumoral em células humanas de leucemia pró-mielocítica (HL-60), carcinoma de pulmão (NCI-H292) (IC₅₀ de 33,1 µg/mL), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e adenocarcinoma de colo uterino (HEP-2) (IC₅₀ > 50 µg/mL), observando-se, por exemplo, atividade citotóxica para as linhagens HL-60 (IC₅₀ de 8,6 µg/mL) e MCF-7 (IC₅₀ de 18,3 µg/mL). Adicionalmente, o óleo essencial apresentou potencial larvicida natural contra o *Aedes aegypti* (LC₅₀ valor de 40,84 ± 0,87 µg/mL). Tal efeito pode estar relacionado à elevada quantidade de compostos sesquiterpenoides (SILVA et al., 2020).

3.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem vários componentes orgânicos que podem ser classificados em metabólitos primários e secundários (WATSON, 2018). Os metabólitos primários estão relacionados ao armazenamento de energia, função estrutural, além do poder redutor a partir de reações de oxido-redução. Por outro lado, os metabólitos secundários são responsáveis por auxiliar na adaptação das plantas a estresses bióticos e abióticos (ALAMGIR, 2018; TAIZ; ZEIGER, 2006), incluindo a defesa contra herbívoros e micróbios. Servem também como sinalizadores para atrair animais polinizadores e dispersores de frutas. Adicionalmente, o consumo de alguns metabólitos secundários tem sido intensificado por suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral e antioxidante (WINK; SCHIMMER, 2018).

De acordo com as propriedades químicas e estruturais, três grupos quimicamente diferentes de metabólitos secundários podem ser observados nas plantas: os compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (POTT; OSORIO; VALLARINO, 2019).

Os compostos fenólicos ou polifenóis são caracterizados por apresentar um anel aromático e, pelo menos, um hidrogênio é substituído por uma hidroxila (SALTVEIT, 2017). As substâncias fenólicas podem ser classificadas em: fenólicos simples, flavonoides (incluindo os grupos: flavonas, flavanonas, flavonóis,

isoflavonoides e antocianidinas), ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxinêmicos), estibenos, cumarinas, ligninas e taninos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). O consumo de compostos fenólicos tem sido relacionado com benefícios à saúde humana, como diminuição dos riscos de câncer, complicações cardíacas, diabetes, efeitos vasodilatadores, potencial antimicrobiano, antialérgico, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral e antioxidante – auxiliando na prevenção de doenças degenerativas (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; WINK; SCHIMMER, 2018).

Entre os compostos fenólicos, destaca-se o grupo dos flavonoides como um dos mais abundantes entre os vegetais. Estão relacionados nas plantas à ação antioxidante, proteção contra a radiação UV, na defesa contra patógenos, coloração das flores e auxiliam na atração de animais polinizadores. Na saúde humana, seu consumo está relacionado a diversos benefícios, como antitumoral, antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano e antioxidante (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). A estrutura química dos flavonoides é caracterizada por um esqueleto básico de benzo-γ-pirona (15-carbonos, representado como C6-C3-C6), que consiste em dois anéis de benzeno (C6) unidos por uma cadeia linear de três carbonos (C3) (LAI et al., 2015), com padrão de substituição diversificado, incluindo hidroxilação, metoxilação, sulfonação, acilação, prenilação, glicosilação, entre outros.

Em extratos metanólicos foliares de nove espécies do gênero *Bauhinia* [*B. alata* Ducke, *B. radiata*, *B. aculeata* L., *B. cupulata* Benth, *B. forficata*, *B. longifolia* (Bong), *B. pentandra* (Bong.), *B. unguata* e *B. purpurea*, os principais grupos de flavonoides encontrados foram: 3- glicosídeos de kaempferol; 3,7- diglicosídeo de kaempferol; glicosídeos de quercetina e glicosídeos de miricetina; glicosil glucósido; ramnosídeo; ramnosídeo-xilosídeo; 7-ramnosídeo; xilosídeo; galactose-glucose; arabinose-galactose; galactose de kaempferol; 3-glucosídeo (SALATINO et al., 1999).

Outros representantes que compõem os compostos fenólicos são os taninos hidrolisáveis, que consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados e conferem proteção às plantas contra a herbivoria (NEWSOME; LI; VAN BREEMEN, 2016). Podem atuar na inibição da peroxidação lipídica e auxiliar na eliminação de radicais como o superóxido, hidroxila e peroxila, compostos importantes no estado pró-oxidante celular, evitando danos oxidativos no DNA (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Os terpenos ou terpenoides estão presentes em diversos produtos naturais. São constituídos pela sobreposição contínua de isopentenilpirofosfato (IPP-C5), uma

estrutura de cinco carbonos, a qual dá origem a diferentes tipos de terpenos, de acordo com a quantidade de carbonos (C): monoterpenos (C₁₀); sesquiterpenos (C₁₅); diterpenos (C₂₀); triterpenos (C₃₀), como as saponinas; tetraterpenos (C₄₀), com destaque para os carotenos e xantofilas, e politerpenos (mais de 40 carbonos) (ROY, 2019). Exibem atividades biológicas como anticancerígenas, antiparasitária, antimicrobiana e antiviral (SULSEN et al., 2013).

Por sua vez, os compostos nitrogenados são caracterizados por fornecer defesas químicas, bem como atrativos para polinizadores. Destacam-se por apresentar quatro classes abundantes: alcaloides, betaláínas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolato, cujas formações ocorrem a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos (ALAMGIR, 2018).

Os alcaloides possuem ao menos um átomo de nitrogênio em seu anel. Com base em seu precursor biossintético e sistema heterocíclico, os compostos foram classificados em diferentes grupos: alcaloides de piridina, pirrolidina, tropane, indolizidina, quinolina, isoquinolina, alcaloides fenantreno, fenetilamina, indol e purina (HIMANSHU et al., 2020). São conhecidos por suas diversas propriedades terapêuticas como anticâncer, antimicrobiana anti-inflamatória, antiviral e analgésica (JIANG et al., 2016; QUINTANA et al., 2020).

Por outro lado, os glicosídeos cianogênicos consistem em uma cadeia de carbono derivada de cinco aminoácidos proteicos (Val, Ile, Leu, Phe e Tyr), sendo eles o β -glicosídeos de α -hidroxinitrilas, os quais são caracterizados por liberar cianeto de hidrogênio quando hidrolisados por β -glicosidases e α -hidroxinitrilases. Podem estar envolvidos no transporte e rotatividade de nitrogênio, e no desenvolvimento das plantas bem como associados à defesa da planta contra patógenos e herbivoria, mediante ativação das β -glucosidases (CUNY et al., 2019).

Os tipos e abundância dos metabólitos secundários nas plantas variam de acordo com as condições ambientais (KUTCHAN, 2001). Estão diretamente relacionados a processos bioquímicos, ecológicos, fisiológicos e evolutivos, assim como a variações temporais e espaciais, como a sazonalidade, ciclo diurno/noturno, nutrientes, disponibilidade de água, altitude, temperatura, entre outros (ANGELOPOULOU; DEMETZOS; PERDETZOGLU, 2002; LINDROTH; HSIA; SCRIBER, 1987; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012). Também o estágio de desenvolvimento da planta e a diferenciação dos órgãos podem influenciar na composição e quantidade dos metabólitos (DOAN; ERVIN; FELTON, 2004; EVANS,

2009), a exemplo de os óleos essenciais, ácidos fenólicos e flavonoides, cuja biossíntese é maior em tecidos vegetais mais jovens (GERSHENZON; MAFFEI; CROTEAU, 1989; JIANG et al., 2013).

As plantas da Caatinga com propriedades medicinais são adaptadas a condições adversas, como os longos períodos de estiagem, induzindo a produção de uma grande quantidade de metabólitos secundários. Entre os representantes da Caatinga, o gênero *Bauhinia* destaca-se por apresentar diversos compostos secundários (Tabela 2), os quais são relacionados a diferentes atividades biológicas.

Tabela 2 - Compostos químicos e suas respectivas classes encontrados em representantes do gênero *Bauhinia*.

Espécie	Classe	Composto químico	Referência
<i>B. candicans</i>	Esteroides	sitosterol; campesterol; estigmasterol; estigmasta-3,5-dieno-7-ona; sitosterol 3-O-β-glucosídeo, sitosterol 3-O-α-D-xilurono-furanosídeo	Iribarren; Pomilio (1987)
	Flavonoides	kaempferol 3-O-β-rutinosídeo; kaempferol 3-O-β-rutinosídeo 7-O-α-rhamno-piranosídeo	
	Alcaloides	trigonelina	
	Álcoois	triacontanol	
	Poliálcoois	3-O-metil-D-inositol (D-pinitol)	
<i>B. championii</i>	Benzenoides	ácido gálico	Chien; Yuh; Hong (1985)
	Glicosídios	Bauhinia	
<i>B. forficata</i>	Flavonoides	kaempferitrina; kaempferol-3-O-α-diraminosídeo	Silva et al. (2000)
	Esteroides	Sitosterol	
<i>B. manca</i>	Esteroides	sitosterol; sitosterol-3-O-β-D-glucosídeo; estigmasta-4-eno-3-ona; estigmasta-4-eno-3,6-diona	Achenbach; Stöcker; Constenla, (1988)
	Benzenoides	ácido cinâmico; cinnamoil-β-D-glucose; éster metílico do ácido (E)-4-hidroxi-cinâmico; éster metílico do ácido (E)-4-hidróxi-3-metoxicinâmico; ácido gálico; galato de metila; éster metílico do ácido 4-hidroxi-2-metoxibenzóico; éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico; éster metílico do ácido 3,4-dihidroxibenzoico; ω-hidroxipropioguaiacona; siringaresinol, (7S,8R,8'R)-5,5-dimetoxilarici-resinol	

	Flavonoides	apigenina; chrisoeriol; luteolina 5,3-dimetoxi; kaempferol; isoliquiritigenina; isoliquiritigenina 2-metoxi; isoliquiritigenina 4-metoxi; echinatina; 2,4-di-hidroxi-4-metoxi-di-hidrochalcona; (2S)-narigenina (2S)-eriodictiol; (2S)-liquiritigenina; (2S)-liquiritigenina 7-metoxi; (2S)-liquiritigenina 4-metoxi; (2S)-7,4-di-hidroxi-flavona; (2S)-7,3-dimetoxi-4-hidroxi-flavona; (2S)-3,4-dimetoxi-7-hidroxi-flavona; (2S)-7,4-dimetoxi-3-hidroxi-flavona	
	Estilbenoides	obtustireno	
B. purpurea	Flavonoides	isoquercitrina; quercetina; astragalina; 5,6-di-hidroxi-7-metoxi-flavona- 6- O-β-D-xilopiranosídio	Vijayakumari; Siddhuraju; Janardhanan, (1997)
B. racemosa	Cromanos	pacharina; Racemosol; des-O-metilracemosol	Prabhakar et al. (1994)
B. reticulata	Flavonoides	quercetina	Salatino et al. (1999)
B. rufescens	Estilbenoides	5,6-di-hidro-11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2-£][1]-benzopirano-8,9-diol; 11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2-£][1]-benzopirano-8,9-diol; 1,7,8,12b-tetra-hidro-2,2,4-trimetil-2H-benzo-[6,7]-ciclo-hepta-[1,2,3-de][1]benzopirano-5,10,11-triol	Maillard et al. (1991)
B. splendens	Esteroides	sitosterol; estigmasterol	Laux; Stefani; Gottlieb (1985)
	Ácidos graxos	ácido esteárico	
	Flavonoides	bausplendina; quercetina; rutina	
	Benzenoide	galato de etila	
B. thoningii	Lactona	Grifonilida	Okwute et al. (1986)
B. uruguayensis	Flavonoides	quercetina -3-O-α-L-ramnopiranosídio; kaempferol -3-O-α-L-ramnopiranosídio	Santos; Fortunato; Spotorno (2019)
B. megalandra	Flavonoides	5,7,5'-tri-hidroxi-2'-O-ramnosil-flavona; 5,7,2'-trihidroxi-5'-O-ramnosil-flavona	Motta et al. (2002)
B. variegata	Esteroides	sitosterol	Gupta; Vidyapati; Chauhan (1980); Persaud; Tiess (1966)
	Triterpenoides	lupeol	
	Flavonoides	narigenina-5,7-dimetoxi-4-ramnoglucosídio; kaempferol-3-galactosídio, kaempferol-3-ramno-glucosídio	

Ao avaliar o extrato etanólico foliar de *B. longifolia*, Aquino et al. (2019) identificaram 75 compostos secundários distribuídos em variadas classes, como por exemplo a bauhiniastatina 2, relacionada com propriedades anticâncer em linhagens

celulares cancerígenas. Santos et al. (2019) reportaram *B. holophylla* como um potente sorotipo 2 da dengue, sendo esta atividade biológica associada à presença de flavonoides, principalmente derivados da quercetina, os quais estariam dificultando a formação do complexo de RNA polimerase viral. Já para o extrato aquoso foliar de *B. purpurea*, a atividade antiulcerogênica foi sugerida pela ação de saponinas e glicosídeos (ZAKARIA et al., 2011), enquanto que a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, alcaloides e carboidratos foi relacionada à propriedades antioxidante e antimicrobiana de *B. racemosa* (RASHED; BUTNARIU, 2014).

3.6 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES DAS PLANTAS MEDICINAIS

Os radicais livres são caracterizados por um átomo, cuja última camada eletrônica é composta por número ímpar de elétrons, exibindo, consequentemente, alta reatividade. Tais radicais estão relacionados a processos denominados oxidação e redução, ou seja, cedem o elétron que estava sozinho ou recebem outro elétron, respectivamente, conferindo assim um número par na última camada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RAMOS-TOVAR; MURIEL, 2019).

Em termos gerais, as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) são produzidas como subprodutos de uma reação redox, destacando-se por serem radicais com maior reatividade. As RNS são originadas a partir da óxido nítrico sintase, já as ROS são formadas em diferentes locais no organismo, como nas mitocôndrias, citoplasma ou no alvo celular, por diversas enzimas, podendo-se citar a NADPH oxidases, xantina oxidase, os complexos de mitocôndrias I (NADH desidrogenase) e III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductase) (RAMZAN; VOGT; KADENBACH, 2020), monoamina oxidase (CADENAS; DAVIES, 2000) e no citocromo P450 (LINHART; BARTSCH; SEITZ, 2014). Além disso, podem também ser produzidos pela ação de agentes externos, como poluição e fonte alimentar (BARBOSA et al., 2014; COTINGUIBA et al., 2013).

Quando a ROS e a RNS estão em equilíbrio nas células, são consideradas benéficas para respostas imunes e funções celulares. Contudo, quando em desequilíbrio, geram o estresse oxidativo, podendo causar distúrbios degenerativos ou crônicos (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; TUNG MUNNITHUM et al., 2018; VALKO et al., 2006). Inicialmente, a geração das ROS era relacionada apenas à

ocorrência de estresse oxidativo, devido a não metabolização adequada dos radicais livres. Contudo, outros estudos têm mostrado a formação das ROS a partir de reações redox (FOYER; NOCTOR, 2012; MITTLER et al., 2011), relacionadas ao metabolismo celular, podendo ocorrer em diversas vias metabólicas como no crescimento celular, produção de energia (Trifosfato de adenosina - ATP) ou na síntese de substâncias, mostrando-se como um processo natural nos organismos vivos (RODRIGUES; BRIZOLA, 2019).

As ROS podem ser classificadas em ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BIRBEN et al., 2012). O ânion-radical superóxido (O_2^-) atua em vários processos celulares, a exemplo de indução de dano celular, defesa imunológica (destruição de patógenos) e redução monoelétrica de O_2 . O radical hidroxila ($OH^\cdot$), por sua vez, pode causar modificações em nível de DNA, danos a proteína, bem como inativação enzimática (RODRIGUES; BRIZOLA, 2019; VASCONCELOS et al., 2007). Por fim, a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) acontece pela reação de dismutação O_2^- , a qual é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), reduzindo dois elétrons na molécula de O_2 . Entretanto, o H_2O_2 não é considerado um radical livre, mas sim, um metabólito de oxigênio deletério, com capacidade de atravessar membranas biológicas (ANDRADE et al., 2010).

O estresse oxidativo tem sido relacionado a processos de transformação, envelhecimento e morte celular, bem como ao câncer e doenças crônicas, devido ao desequilíbrio de produção das ROS e antioxidantes, propiciando danos ao DNA, proteínas e lipídeos (BILLER; TAKAHASHI, 2018; VASCONCELOS et al., 2007). Os radicais O_2^- e $OH^\cdot$ são as causas mais comuns de danos ao DNA, uma vez que a oxidação mediada pelos mesmos induz à quebra de fita simples ou dupla, modificação de base ou *cross-linking* com proteínas (UMENO; BIJU; YOSHIDA, 2017). Os danos causados no DNA pelo $OH^\cdot$ podem ser associados pelas vias de adição às ligações duplas de anéis aromáticos, a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metil da timina, bem como adições às bases de pirimidina e purina. Contudo, entre essas reações, a principal via oxidativa ao DNA é a 8-hidroxiguanina (8-OxoGua) mediante hidroxilação da guanina pela abstração de um átomo de hidrogênio por $OH^\cdot$ (CADET et al., 2017; UMEMO; BIJU; YOSHIDA, 2017).

Alguns sistemas de defesa celular contra o estresse oxidativo podem ser citados. Os mecanismos de reparo do DNA, por exemplo, são acionados para reparar as lesões ocasionadas pelas ROS no DNA. Dentre eles, cita-se o Fator Nuclear kappa-

B (NFκB - *Nuclear Fator kappa-B*), que é ativado por processos inflamatórios causados pelas ROS/ RNS e citocinas inflamatórias, migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes específicos para a regulação da resposta imunitária à infecção (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUD, 2009). Outro mecanismo é a ativação de genes por meio do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2 - nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), cuja expressão permite a ativação de antioxidantes promovendo a homeostase da ROS e RNS (MA, 2013). Adicionalmente, destaca-se também a Via por Excisão de Bases (BER - *Base Excision Repair*), que ocorre nas mitocôndrias revertendo os danos em única base induzidos por ROS, a exemplo do reparo de bases desaminadas como hipoxantinas ou bases alquiladas como 7-metilguanina (SAS; SZABÓ; VÉCSEI, 2018).

Os antioxidantes podem ser classificados em endógenos ou exógenos (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). Eles atuam no retardo ou prevenção da oxidação do substrato, diminuindo os riscos de doenças devido a sua ação de redução, quelação de íons metálicos e eliminação de radical (KUMAR; CHAITANYA; PREEDY, 2018). Os antioxidantes endógenos, produzidos naturalmente pelo corpo humano, neutralizam as ROS, prevenindo a ocorrência de danos na estrutura celular. São representados por dismutase (SOD), peroxiredoxina (PRx), glutational peroxidase (GTPx), glutational transferase (GST), tioredoxina (TRX) e catalase (CAT). Por outro lado, os antioxidantes exógenos são aqueles obtidos via alimentar e que atuam de forma coadjuvante às enzimas endógenas.

Neste contexto, as plantas são apontadas como importantes fontes de antioxidantes, sendo utilizadas tanto para fins nutricionais quanto para prevenção de doenças. Dentre os compostos ou grupos de fitoquímicos de reconhecida atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides, fenilpropanoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico (vitamina C), retinol (vitamina A), tocoferol (vitamina E), selênio, ácido úrico, entre outros (ANDRADE et al., 2010; BIRBEN et al., 2012).

3.6.1 Testes bioquímicos para avaliação do potencial antioxidante

Testes bioquímicos têm sido aplicados para comprovar o potencial antioxidante de materiais vegetais, utilizando métodos que detectam e quantificam a presença de radicais. De uma forma geral, os radicais gerados reagem com moléculas-alvo,

resultando em cores diferenciais, fluorescência ou minescência (VASCONCELOS et al., 2007).

Levando em consideração os diferentes tipos de radicais livres e suas diversas formas de atuação, vários ensaios têm sido descritos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais de forma isolada ou conjunta. A vantagem de avaliar o potencial antioxidante de uma planta por diferentes metodologias é o aumento da confiabilidade em relação ao potencial antioxidante (COTINGUIBA et al., 2013). Entre os testes realizados, destacam-se o DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] e o fosfomolibdênio, cujos resultados podem ser expressos em Miligrama (mg) ou pelo EC₅₀, considerado a concentração efetiva para redução dos radicais livres a 50% do observado para efeito antioxidante máximo (PIRES et al., 2017).

O DPPH é um dos testes antioxidantes mais utilizados por apresentar radical estável, resposta rápida e custo relativamente baixo. É baseado no processo de redução do radical DPPH[•] (cor violeta) para DPPH-H (cor amarela), mediante um processo de oxirredução (transferência de elétrons), devido a presença de uma substância antioxidante. Uma substância com potencial antioxidante em contato com o DPPH[•] doa um átomo de hidrogênio ao mesmo, acarretando sua redução à DPPH-H[•] e a formação da hidrazina, responsável pela diferenciação de coloração das amostras (Figura 4) (PIRES et al., 2017).

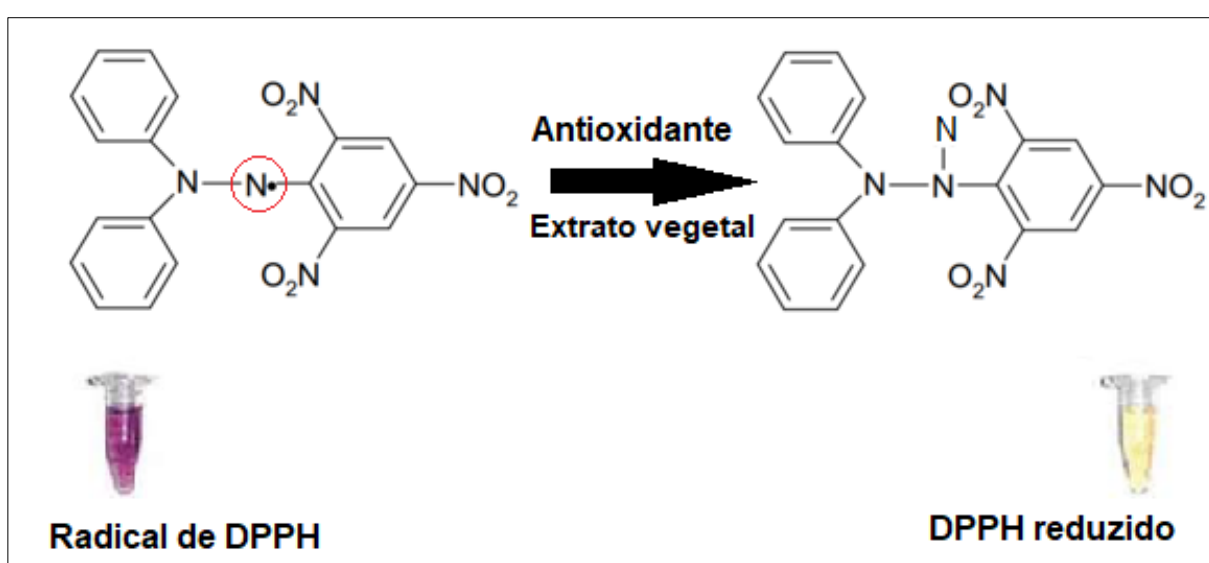


Figura 4 - Reação do teste de DPPH. O radical DPPH[•] (coloração roxa) sofre uma redução mediante contato com um extrato vegetal com potencial antioxidante, transformando-se em DPPH-H (coloração amarela). Fonte: Pires et al. (2017), com algumas adaptações.

Outro teste bastante utilizado é o ABTS (Figura 5), notando-se um decréscimo na absorbância, quando este é capturado por antioxidantes. Caracterizado por ser um cromóforo quimicamente estável, o ABTS pode ser utilizado em amostras tanto hidrossolúveis quanto lipossolúveis. A coloração é representada pelo ABTS^+ (verde-escuro), por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio e com a adição do antioxidante ocorre a redução da coloração no meio reacional (verde-claro) (PIRES et al., 2017). A partir da diminuição e/ou perda da coloração, é possível observar a porcentagem de inibição do ABTS mediante função do Trolox, que é um padrão antioxidante submetido às mesmas condições de análise que o material testado, à exemplo do ácido ascórbico (BORGES et al., 2011).

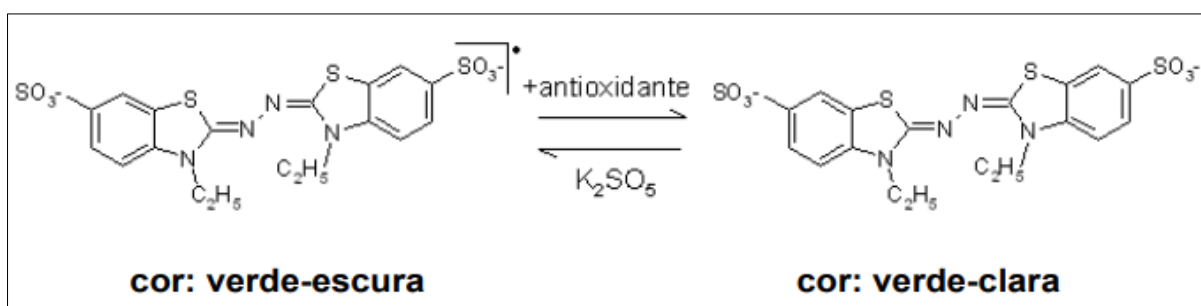


Figura 5 - Reação da redução do ABTS^+ [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Fonte: Rufino et al. (2007).

O método do fosfomolibdênio também é considerado um teste rápido, de baixo custo e apresenta eficiência quanto à avaliação da capacidade antioxidante total dos componentes lipofílicos e hidrofílicos. O complexo do fosfomolibdênio apresenta uma coloração amarela, a qual é modificada para verde, mediante uma redução pelo contato com o material testado de potencial antioxidante (CAMPOS; FRASSON, 2012).

Nos testes para comprovação da atividade antioxidante, é necessário utilizar substâncias padrão como controle positivo. Um dos padrões mais utilizados é o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, que é hidrossolúvel e está presente no fluido extracelular. Reduz significativamente as ROS e previne a formação de hidroperóxido de lipídios, permitindo a proteção das células de danos oxidativos (ANDRADE et al., 2010). Outra opção é a quercetina, um bioflavonoide que elimina os radicais livres e inibe a oxidação das biomoléculas, sendo capaz de formar espécies radicais estáveis após a interação com pequenas espécies radicais reativas, em um processo

conhecido como eliminação de radicais (SANDERS; RAUSCHER; WATKINS III, 2001).

Em representantes do gênero *Bauhinia*, estudos têm apontado um grande potencial antioxidante. Aliyu et al. (2009) indicaram atividade antioxidante para o extrato metanólico das folhas de *B. rufescens* mediante a eliminação de DPPH como dose-dependente nas concentrações 50, 125 e 250 µg/mL. Tal potencial pode estar relacionado ao efeito sinérgico de flavonoides, taninos e saponinas detectados por caracterização fitoquímica. Extratos foliares de *B. variegata* (aquoso, etanólico, benzeno, clorofórmio, acetato de etila e acetona) também apresentaram eficiência contra danos oxidativos, devido a sua capacidade de poder redutor, ligação de ferro, bem como pela neutralização do radical, propriedades que foram associadas aos flavonoides presentes em sua composição (MISHRA et al., 2013).

3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE FITOCONSTITUINTES PRESENTES EM PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais apresentam misturas complexas de compostos biologicamente ativos, os quais podem trazer benefícios à saúde humana, mediante às atividades antioxidantes, anti-inflamatórios, antimutagênicas, antimicrobianas, entre outras (ALIYU et al., 2009; DAS; JAGANNATH; DINDA, 2012; GOWRI; CHINNASWAMY, 2011). Entretanto, apesar de seus benefícios terapêuticos, também podem exibir propriedades tóxicas, de natureza citotóxica, genotóxica, mutagênica ou carcinogênica, bem como ocasionar alterações em nível de DNA. Tais danos podem afetar processos como a replicação e transcrição de genes e gerar alterações cromossômicas, levando ao câncer e processos de morte celular (PING et al., 2012).

Devido aos efeitos adversos dos fitoconstituintes e suas interações, agências governamentais têm exigido a realização de prévia de testes de segurança para o uso das plantas medicinais, incluindo testes toxicológicos *in vivo* e *in vitro*, os quais seguem protocolos internacionais recomendados pela FDA (*Food and Drug Administration*; Administração de Alimentos e Medicamentos) (FDA, 2010), EMA (*European Medicines Agency*; Agência Europeia de Medicamentos) (EMA, 2013) e OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*; Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (OECD, 2016). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pelas diretrizes para os

testes de avaliação da segurança, bem como qualidade e eficácia dos possíveis fitoterápicos (ANVISA, 2014).

As agências regulamentadoras têm incentivado o uso de testes preliminares usando cultura de células *in vitro*, em investigações toxicológicas para o desenvolvimento de compostos medicinais, a fim de reduzir o grande número de animais necessários em testes de toxicidade *in vivo* (CANNELLA et al., 2019). Os testes *in vitro* apresentam bom controle das condições experimentais e alta reprodutibilidade das condições dos testes e de seus resultados. Permitem analisar qualquer substância com facilidade, rapidez, segurança e boa correlação com os resultados *in vivo* (ARAÚJO et al., 2015). Adicionalmente, a disponibilidade de bancos de células provenientes de diferentes organismos permite maior acesso e uso de modelos *in vitro*, tornando-se uma importante alternativa para as avaliações de toxicidade (CELIK, 2012; CERQUEIRA, 2008; DOS REIS; DALMOLIN; DALLEGRAVE, 2017).

Diferentes testes podem ser utilizados na investigação do modo de ação e dos efeitos dos princípios ativos das plantas medicinais nas células e em seu material genético. Os ensaios de citotoxicidade avaliam o potencial de um composto candidato produzir danos na função de organelas ou estruturas vitais para as células, como mitocôndrias e membranas plasmáticas, e/ou induzir interferência no ciclo mitótico. Os testes de citotoxicidade são utilizados também para definir concentrações a serem usadas em testes *in vitro* posteriores (ARAÚJO et al., 2015; EMA 2013; FDA 2010), e podem ser divididos em dois tipos.

O primeiro tipo aplica testes citogenéticos ou genotóxicos na avaliação do ciclo celular, podendo ser utilizados os seguintes ensaios: (1) RICC (*Relative Increase in Cell Counts*; Aumento Relativo na Contagem de Células); (2) RPD (*Relative Population Doubling*; Duplicação da População Relativa); (3) CBPI (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*; Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese), e (4) RI (*Replicative Index*; Índice Replicativo). Os quatro ensaios analisam células que passaram por um ou mais ciclos de exposição ao composto candidato. A interpretação dos resultados deve seguir as medidas de padronização geradas pela OCDE a fim de aumentar a confiabilidade dos dados (OCDE, 2015).

Por sua vez, o segundo tipo investiga alterações em nível de integridade celular, apoptose e necrose, bem como de ciclo celular, mediante metodologias baseadas no uso de corantes ou reagentes químicos atuantes como marcadores

enzimáticos (ARAÚJO et al., 2015). Testes como vermelho neutro, formação de colônias, 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) e brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT) são recomendados pela ISO 10993-5-2009 (MILLER et al. 2017).

O método de MTT, descrito por Mosmann (1983), baseia-se na atividade da enzima mitocondrial desidrogenase succínica. Em células viáveis, essa enzima cliva o MTT produzindo os cristais de formazan, os quais são insolúveis e apresentam coloração violeta (Figura 6). Por outro lado, em células não viáveis, o MTT não é clivado e, conseqüentemente, os cristais de formazan não são formados, resultando em uma suspensão celular com coloração translúcida e/ou amarelada. Assim, a porcentagem da viabilidade celular é mensurada mediante leitura da absorbância em espectrofotômetro. Quanto mais escura a suspensão celular, maior o número de células viáveis e metabolicamente ativas (ARAÚJO et al., 2015).

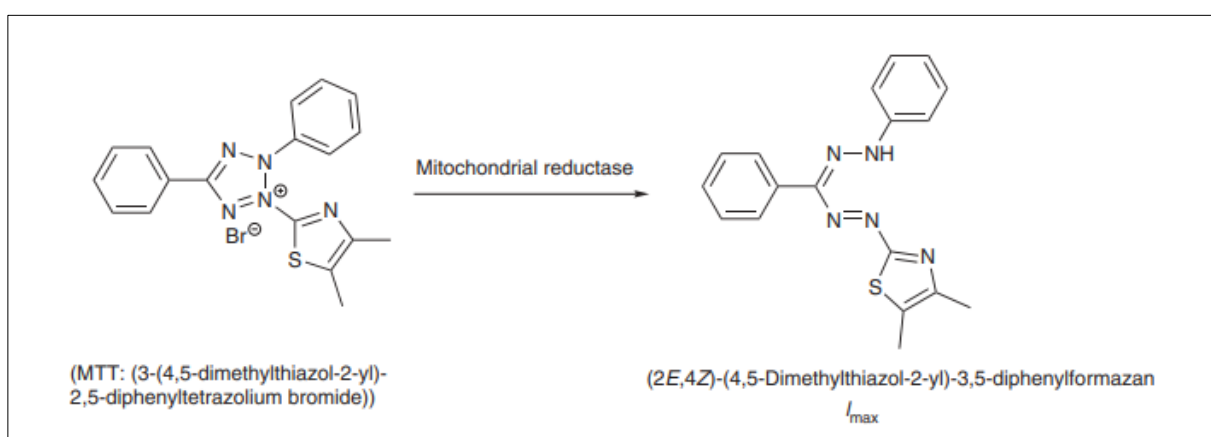


Figura 6 - Estrutura química do MTT no processo de clivagem na mitocôndria em células viáveis. Fonte: Ebada et al. (2008).

Diferentes linhagens celulares são recomendadas para a validação dos ensaios citotóxicos por distintos protocolos. As linhagens BALB / c 3T3 (fibroblastos de camundongo), MRC-5 (pulmão de feto humano), WI-38 (pulmão de feto humano), Vero (rim de macaco), V79 (fibroblasto de pulmão de hamster), BHK-21 (rim do Hamster sírio) e L929 (fibroblastos de camundongo) são indicadas pelo ISO 10993-5-2009, enquanto que os linfócitos de sangue periférico de mamíferos, culturas primárias humanas, CHO (ovário de hamster Chinês), V79, CHL/IU (Células pulmonares de hamster chinês), L5178Y (linfoma de camundongo) e TK6 (linfoblastoma humano) são recomendadas por OECD TG 473 e 487. Adicionalmente,

a OECD TG 473 e 487 também indicam as linhagens HT29, Caco-2 (adenocarcinoma de cólon de humano), HepaRG (hepáticas diferenciadas), HepG2 (derivada de hepatocarcinoma humano), A549 (carcinoma de pulmão humano) e células embrionárias de hamster Syrian, embora ainda estejam em processo de validação (OECD, 2016 a, b). Entre as células citadas, destaca-se a linhagem L929 de fibroblasto de camundongo, considerada uma das primeiras linhagens celulares estabelecidas em cultura contínua (DROZD et al., 2019). É uma linhagem derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de camundongos machos (C3H/Na) de 100 dias, cuja cultura foi estabelecida por WR Earle em 1940 (BCRJ-0188, 2020).

Vários estudos têm reportado as propriedades tóxicas de extratos vegetais e de seus derivados utilizados na medicina popular, incluindo o potencial citotóxico de plantas do bioma Caatinga mediante ensaio de MTT. O extrato bruto da casca do caule da espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (pereiro), por exemplo, apresentou potencial antimalárico e não citotóxico, mesmo nas maiores concentrações testadas em células BGM (rim de macaco) ($MLD_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$), embora seus extratos brutos da raiz e folhas tenham apresentado citotoxicidade ($MLD_{50} = 287$ a $486 \mu\text{g/mL}$) (CERAVOLO et al., 2018). Outro representante avaliado foi *Zizyphus joazeiro* Mart. (juazeiro) com atividade anti-helmíntica e não citotóxica para o extrato aquoso da casca do caule para a linhagem celular Vero (IC_{50} de $0,75 \text{ mg/mL}$). Contudo, um efeito citotóxico dose-dependente foi observado nas concentrações mais altas do extrato ($0,8$ a $2,7 \text{ mg/mL}$) e para as frações de saponinas (IC_{50} de $0,20 \text{ mg/mL}$), sugerindo as saponinas como responsáveis pelo efeito citotóxico de *Z. joazeiro* (GOMES et al., 2016).

Estudos de citotoxicidade utilizando o ensaio de MTT também foram reportados para espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia*. Extratos foliares de *B. galpinii* com potencial antioxidante e antimicrobiano, por exemplo, não apresentaram atividades citotóxicas nas células Vero para os extratos aquoso e hidroetanólico nas concentrações entre 25 e $1000 \mu\text{g/mL}$ (LC_{50} de $107 \mu\text{g/mL}$ para o aquoso e $94 \mu\text{g/mL}$ para o hidroetanólico) (ERHABOR et al., 2020). Adicionalmente, o extrato etanólico das folhas de *B. platypetala* (25 a $200 \mu\text{g/mL}$) com potencial antioxidante apresentou efeito citotóxico em células V79 apenas na concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ ($62,43\%$) (SANTOS et al., 2012).

Assim, considerando o potencial da pata-de-vaca para a geração de produtos farmacológicos, torna-se necessário avaliar as atividades biológicas, bem como os

possíveis efeitos adversos do uso desses vegetais mediante estudos citogenotóxicos, principalmente em espécies cujas análises são escassas e/ou inexistentes, a exemplo da *B. cheilantha*.

REFERÊNCIAS¹

- ACHENBACH, H.; STÖCKER, M.; CONSTENLA, M. A. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1835-1841, 1988.
- ALAMGIR, A. N. M. **Therapeutic use of medicinal plants and their extracts: Volume 2: phytochemistry and bioactive compounds**. Springer, 2018.
- ALBERGARIA, E. T.; SILVA, M. V.; SILVA, A. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais do município de Lagoa Grande, Pernambuco, Brasil. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 13, p. 137-154, 2019.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ALVES, R. R. N. **Introduction to Ethnobiology**. Springer, 2016.
- ALIYU, A. B.; IBRAHIM, M. A.; MUSA, A. M.; IBRAHIM, H.; ABDULKADIR, I. E.; OYEWALE, A. O. Evaluation of antioxidant activity of leave extract of *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpiniaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 8, p. 563-567, 2009.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. D. L.; DE AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. D. S.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, n. 1, p. 127-142, 2005.
- ALVES MARTINS, J. J.; CORDEIRO, S. F.; TRINDADE, R. A. P.; NOBRE, M. J.; PALMEIRA GOMES, J. Study of the drying kinetics of leaves *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (mororó). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 4, p. 397-408, 2015.
- AMORIM, I. L. D.; SAMPAIO, E. V.; ARAÚJO, E. D. L. Flora e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 19, n. 3, p. 615-623, 2005.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 3, p. 189-203, 2002.
- ANNEGOWDA, H. V.; MORDI, M. N.; RAMANATHAN, S.; HAMDAN, M. R.; MANSOR, S. M. Effect of extraction techniques on phenolic content, antioxidant and

¹ De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC determination of antioxidants. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 2, p. 226-233, 2012.

ANVISA, Agência de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, de 13 de maio de 2014. Resolução RE 90, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, p. 2–5, 2014.

ARAÚJO, S. D. S.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity assays of medicinal plants: first step for drug development. **Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market**, p. 130-153, 2015.

ASLAM, M. S.; AHMAD, M. S. Worldwide importance of medicinal plants: current and historical perspectives. **Recent Adv Biol Med**, v. 2, n. 2016, p. 909, 2016.

AQUINO, A. J.; ALVES, T. D. C.; OLIVEIRA, R. V.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B. Perfil químico secundário do metabolito de extratos etanólicos de folhas de *Bauhinia longifolia*. **Culturas e Produtos Industriais**, v. 132, p. 59-68, 2019.

BARBOSA, M. R.; ARAÚJO SILVA, M. M.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BCRJ - Banco de células do Rio de Janeiro. Caracterização das culturas celulares. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.nce.ufrj.br/bcrj/Joomla_busca1.asp?bcrj=0188>. Acesso em 11. Abr. 2020.

BILLER, J. D.; TAKAHASHI, L. S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3403-3414, 2018.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BOONPHONG, S.; PUANGSOMBAT, P.; BARAMEE, A.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTA KOOP, P. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 5, p. 795-801, 2007.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. D. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BRANCO, D. A. B. C. **Interações medicamentosas**. Editora Senac São Paulo, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – **Brasília: Ministério da Saúde**, p. 190, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plantas de Interesse ao SUS. Portal da saúde [online]. 2017. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>>. Acesso em 28. Jan. 2020.

BRESOLIN, S.; FERRÃO VARGAS, V. M. Mutagenic potencies of medicinal plants screened in the Ames test. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 3, p. 260-262, 1993.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CADET, J.; DAVIES, K. J.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P.; WAGNER, J. R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 13-34, 2017.

CAMPANHA, M. M.; ARAÚJO, F. S. Árvores e arbustos do sistema agrossilvipastoril caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

CAMPOS, J. S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2012.

CANNELLA, V.; ALTOMARE, R.; CHIARAMONTE, G.; DI BELLA, S.; MIRA, F.; RUSSOTTO, L.; GUERCIO, A. Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

CERAVOLO, I. P.; ZANI, C. L.; FIGUEIREDO, F. J.; KOHLHOFF, M.; SANTANA, A. E.; KRETTLI, A. U. *Aspidosperma pyrifolium*, a medicinal plant from the Brazilian caatinga, displays a high antiplasmodial activity and low cytotoxicity. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 436, 2018.

CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; SANTOS, L. S.; VIANA, E. P.; DE ALMEIDA, S. S. M. S.; MARCONATO, E.; RODRIGUES, M.; VAN DE KAMP, A. Anti-inflammatory and analgesic activities of the crude extracts from stem bark of *Bauhinia guianensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 4, p. 281-284, 1999.

CELIK, T. A. Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. **A Compendium of Essays on Alternative Therapy**, p. 233-250, 2012.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 47-49, 2008.

CHAUDHARI, M. G.; JOSHI, B. B.; MISTRY, K. N. *In vitro* anti-diabetic and anti-inflammatory activity of stem bark of *Bauhinia purpurea*. **Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences (BOPAMS)**, v. 1, n. 2, 2013.

CHIEN, C.; YUH, P.; HONG, Y. *Bauhinin*, A new nitrile glucoside from *bauhinia championii*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 6, p. 933, 1985.

- COTINGUIBA, G. G.; DO NASCIMENTO SILVA, J. R.; DE SÁ AZEVEDO, R. R.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2013.
- CUNY, M. A.; LA FORGIA, D.; DESURMONT, G. A.; GLAUSER, G.; BENREY, B. Role of cyanogenic glycosides in the seeds of wild lima bean, *Phaseolus lunatus*: defense, plant nutrition or both?. **Planta**, v. 250, n. 4, p. 1281-1292, 2019.
- DA FONSECA VAZ, A. M. S.; AZEVEDO TOZZI, A. M. G. *Bauhinia* ser. *Cansenia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil. **Rodriguésia**, v. 54, n. 83, p. 55-143, 2003.
- DAS, S. N.; JAGANNATH, P. V.; DINDA, S. C. Evaluation of anti-inflammatory, anti-diabetic activity of Indian *Bauhinia vahlii* (stembark). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1382-S1387, 2012.
- DHALE, D. A. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Bauhinia variegata* Linn. **Journal of Ecobiotechnology**, 2011.
- DOAN, A. T.; ERVIN, G.; FELTON, G. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *Physalis angulata*: seasonal and ontogenetic gradients. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 2, p. 117-126, 2004.
- DO NASCIMENTO, J. M. L.; MORAES, T. A. L.; SILVA, E. M.; MELO, N. F.; MELO, A. M. Y. Crescimento de plantas de *Bauhinia cheilanta* micorrizadas em dois tipos de solo do bioma Caatinga. **Embrapa Semiárido-Artigo em Periódico Indexado (ALICE)**, 2014.
- DOS REIS, A.; DALMOLIN, S. P.; DALLEGRAVE, E. Animal models for hearing evaluations: a literature review. **Revista CEFAC**, v. 19, n. 3, p. 417-428, 2017.
- DROZD, E.; BUBKO, I.; JAWORSKA, K.; GRUBER-BZURA, B. M. The application of an *in vitro* micronucleus test in mouse fibroblast L929 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 841, p. 36-42, 2019.
- EBADA, S. S.; EDRADA, R. A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1820, 2008.
- EMA - European Medicines Agency. ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. Ema, London, 2013.
- EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy, International Edition E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2009.
- ERHABOR, J. O.; OMOKHUA, A. G.; ONDUA, M.; ABDALLA, M. A.; MCGAW, L. J. Pharmacological evaluation of hydro-ethanol and hot water leaf extracts of *Bauhinia galpinii* (Fabaceae): A South African ethnomedicinal plant. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 28-34, 2020.
- FDA – Food and Drug Administration. M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. EUA, Rockville, 2010.

FERNANDES, J. M.; GARCIA, F. C. P. Leguminosae em dois fragmentos de floresta estacional semidecidual em Araponga, Minas Gerais, Brasil: arbustos, subarbustos e trepadeiras. **Rodriguésia**, p. 525-546, 2008.

FERRAZ, E. M. N.; RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V.; PEREIRA, R. D. C. A. Composição florística em trechos de vegetação de caatinga e brejo de altitude na região do Vale do Pajeú, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 1, p. 7-15, 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, P. S. M.; TROVÃO, D. M. B. M.; MELO, J. I. M. Leguminosae na APA do Cariri, Estado da Paraíba, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 531-547, 2015.

FILHO, A. W.; BREVIGLIERI, E.; FILHO, V. C.; SANTOS, A. R. Antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 823-827, 1997.

FORTUNATO, R. H. Revision del genero *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para la Argentina. **Darwiniana**, p. 527-557, 1986.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 2, p. 199-201, 2012.

FRANÇA, I. S. X. D.; SOUZA, J. A. D.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. D. S. Medicina popular: benefícios y malefícios de las plantas medicinales. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GERSHENZON, J.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). **Plant Physiology**, v. 89, n. 4, p. 1351-1357, 1989.

GIULIETTI, A. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. D. G. L.; VAN DEN BERG, C. A. S. S. I. O. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **MEGADIVERSIDADE**, v. 1, n. 1, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GOMES, D. C.; DE LIMA, H. G.; VAZ, A. V.; SANTOS, N. S.; SANTOS, F. O.; DIAS, Ê. R.; BATATINHA, M. J. M. *In vitro* anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 10-16, 2016.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; MÁRQUEZ, A. H.; CAPOTE-ZULUETA, J. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 84-90, 2003.

GOWRI, S.; CHINNASWAMY, P. Evaluation of *in vitro* antimutagenic activity of *Caralluma adscendens* Roxb. In bacterial reverse mutation assay. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, n. 4, p. 27-34, 2011.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R.; BEELLEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

GUPTA, A. K.; VIDYAPATI, T. J.; CHAUHAN, J. S. Chemical examination of the stem of *Bauhinia variegata*. **Planta Medica**, v. 38, n. 02, p. 174-176, 1980.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI, B. B.; SELVEN, V. T. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 267-273, 2005.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HIMANSHU, J.; JADON, G.; BHADAURIA, R. S.; KISHOR, A. A review article on: plant alkaloids. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Erudition**, v. 9, 2020.

IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B. Sitosterol 3-O- α -D-xyluronofuranoside from *Bauhinia candicans*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 857-858, 1987.

ISO, I. 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Organization for Standardization, Geneva**, 2009.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmed Pharmacology**, v. 7, n. 1, 2018.

JIANG, Q. W.; CHEN, M. W.; CHENG, K. J.; YU, P. Z.; WEI, X.; SHI, Z. Therapeutic potential of steroidal alkaloids in cancer and other diseases. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 119-143, 2016.

JIANG, X.; LIU, Y.; LI, W.; ZHAO, L.; MENG, F.; WANG, Y.; GAO, L. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant [*Camellia sinensis*]. **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e62315, 2013.

KHANSARI, N.; SHAKIBA, Y.; MAHMOUDI, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 73-80, 2009.

KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; SUNDERAM, R. S.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; GOMATHI, P.; KUMAR, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 1015-1024, 2005.

KUMAR, S.; CHAITANYA, R. K.; PREEDY, V. R. Assessment of antioxidant potential of dietary components. In: **HIV/AIDS**. Academic Press, p. 239-253, 2018.

KUMAR, V.; RATHORE, K.; JAIN, P.; AHMED, Z. Biological activity of *Bauhinia racemosa* against Diabetes and Interlinked Disorders like Obesity and Hyperlipidemia. **Clinical Phytoscience**, v. 3, n. 1, p. 7, 2017.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

LAI, C. S.; WU, J. C.; HO, C. T.; PAN, M. H. Disease chemopreventive effects and molecular mechanisms of hydroxylated polymethoxyflavones. **Biofactors**, v. 41, n. 5, p. 301-313, 2015.

LAUX, D. O.; STEFANI, G. M.; GOTTLIEB, O. R. Bausplendin, a dimethylenedioxyflavone from *Bauhinia splendens*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 1081-1084, 1985.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária UFPE, 2003.

LESSA, T.; SANTOS, J. W.; CORREIA, R. A.; LADLE, R. J.; MALHADO, A. C. Known unknowns: Filling the gaps in scientific knowledge production in the Caatinga. **PloS One**, v. 14, n. 7, p. e0219359, 2019.

LINDROTH, R. L.; HSIA, M.T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 6, p. 681-686, 1987.

LINHART, K.; BARTSCH, H.; SEITZ, H. K. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. **Redox Biology**, v. 3, p. 56-62, 2014.

LIYANAARACHCHI, G. D.; SAMARASEKERA, J. K. R. R.; MAHANAMA, K. R. R.; HEMALAL, K. D. P. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 597-605, 2018.

LPWG. The Legume Phylogeny Working Group. BRUNEAU, A.; DOYLE, J. J.; HERENDEEN, P.; HUGHES, C.; KENICER, G.; WOJCIECHOWSKI, M. F. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013.

LPWG. The Legume Phylogeny Working Group. AZANI, N.; BABINEAU, M.; BAILEY, C. D.; BANKS, H.; BARBOSA, A. R.; PINTO, B. R.; BOATWRIGHT, J. S.; BORGES, L. M. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **V. 66**, n. 1, p. 44-77, 2017.

LUNA, J. D. S.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R. F.; DE OMENA, M. C.; DE MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.

MACÊDO, M. F. S.; SISENANDO, H. A.; QUEIROZ, J. D. F.; ARGOLO, A. C.; SATURNINO, A. C. R. D.; COELHO, L. C.; MEDEIROS, S. R. Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 509-516, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAILLARD, M. P.; RECIO-IGLESIAS, M. C.; SAADOU, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Novel Antifungal Tetracyclic Compounds from *Bauhinia rufescens* Lam. **Helvetica Chimica Acta**, v. 74, n. 4, p. 791-799, 1991.

MARTINELLI-SENEME, A.; POSSAMAI, E.; SCHUTA, L. R.; VANZOLINI, S. Germinação e sanidade de sementes de *Bauhinia variegata*. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 719-724, 2006.

MILLER, F.; HINZE, U.; CHICHKOV, B.; LEIBOLD, W.; LENARZ, T.; PAASCHE, G. Validation of eGFP fluorescence intensity for testing *in vitro* cytotoxicity according to ISO 10993-5. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 715-722, 2017.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; PANDEY, A. K. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G. A. D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave?. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. D. A.; SANTOS, M. V. F. D.; FERREIRA, M. D. A.; ARAÚJO, G. G. L. D.; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, G. C. D. Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1643-1651, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, N.; GONZÁLEZ-MUJICA, F.; PERDOMO, E.; MENDEZ, J.; HASEGAWA, M. Inhibición de la Neoglucogénesis y de la Glucosa 6-Fosfatasa Hepática por Flavonas purificadas a partir de hojas de *Bauhinia Megalandra*. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 25, n. 1, p. 37-40, 2002.

NEWSOME, A. G.; LI, Y.; VAN BREEMEN, R. B. Improved quantification of free and ester-bound gallic acid in foods and beverages by UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1326-1334, 2016.

NOGUEIRA, A. C. O.; SABINO, C. V. Revisão do Gênero *Bauhinia* abordando aspectos científicos das espécies *Bauhinia forficata* Link e *Bauhinia variegata* L. de

interesse para a indústria farmacêutica. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2013.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Guidance document on revisions to OECD genetic toxicology test guidelines. August 31, 2015.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Guideline for the testing of chemicals. 487: *in vitro* mammalian cell micronucleus test. 2016a.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. TG 473: *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test. 2016b

OKWUTE, S. K.; NDUKWE, G. I.; WATANABE, K.; OHNO, N. Isolation of griffonilide from the stem bark of *Bauhinia thonningii*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 716-717, 1986.

OLIVEIRA, P. T. B.; TROVÃO, D. M. D. B. M.; DE CARVALHO, E. C. D.; DE SOUZA, B. C.; FERREIRA, L. M. R. Florística e fitossociologia de quatro remanescentes vegetacionais em áreas de serra no cariri paraibano. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 169-178, 2009.

OLIVEIRA, R. M.; LIMA, R. A. Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Bauhinia forficata* L. e seu potencial candidacida. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 1, 2017.

PANDEY, S.; AGRAWAL, R. C. Clastogenic analysis of *Bauhinia variegata* bark extract using micronucleus assay in mouse bone marrow cells. **Am-Eurasian J Toxicol Sci**, v. 2, p. 112-114, 2010.

PAULA ALVES, J.; ANDRADE, D. L.; BARROS, A. P.; BORGES, F. J. S.; DA SILVA, S. D. D. Diagnóstico do uso de plantas medicinais no Povoado Vila 16 no município de Augustinópolis–TO. **Encontro Regional de Agroecologia do Nordeste**, v. 1, n. 1, 2018.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

PEREIRA, R.; SOUZA, E. B. D.; FONTENELLE, R. O. D. S.; VASCONCELOS, M. A. D.; SANTOS, H. S. D.; TEIXEIRA, E. H. Structural diversity and biological potential of secondary metabolites of species of *Myroxylon* Lf (Fabaceae): a review of the literature. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, 2019.

PERSAUD, T. V. N.; TIESS, D. Plazentare Übertragung von Äthylbarbital. **Naturwissenschaften**, v. 53, n. 15, p. 385-385, 1966.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

PING, K. Y.; DARAH, I.; YUSUF, U. K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017.

POTT, D. M.; OSORIO, S.; VALLARINO, J. G. From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

PRABHAKAR, P.; GANDHIDASAN, R.; RAMAN, P. V.; KRISHNASAMY, N. R.; NANDURI, S. De-o-methylracemosol: a tetracyclic 2, 2-dimethylchroman from the roots of *Bauhinia racemosa*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 817-818, 1994.

QUINTANA, V. M.; SELISKO, B.; BRUNETTI, J. E.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J. C.; CANARD, B.; CASTILLA, V. Antiviral activity of the natural alkaloid anisomycin against dengue and *Zika viruses*. **Antiviral Research**, v. 176, p. 104749, 2020.

RAHMAN, M. A.; AKHTAR, J.; ARSHAD, M. Evaluation of cytotoxic potential and apoptotic effect of a methanolic extract of *Bauhinia racemosa* Lam. against a human cancer cell line, HeLa. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n. 4, p. 513-518, 2016.

RAMÍREZ-DE ANDA, M. P.; COLÍN, R. T. Revisión taxonómica del complejo *Bauhinia macranthera* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Cercideae), un grupo endémico del centro y noreste de México. **Brittonia**, v. 59, n. 4, p. 357-369, 2007.

RAMOS-TOVAR, E.; MURIEL, P. Free radicals, antioxidants, nuclear factor-E2-related factor-2 and liver damage. **Jornal de Toxicologia Aplicada**, v. 40, n. 1, p. 151-168, 2019.

RAMZAN, R.; VOGT, S.; KADENBACH, B. Stress-mediated generation of deleterious ROS in healthy individuals-role of cytochrome c oxidase. **Journal of Molecular Medicine**, p. 1-7, 2020.

RASHED, K.; BUTNARIU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Bauhinia racemosa* Lam. and chemical content. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 13, n. 3, p. 1073, 2014.

RASOOL HASSAN, B. Medicinal plants (importance and uses). **Pharmaceut Anal Acta**, v. 3, p. e139, 2012.

RIBEIRO, D. L.; CILIÃO, H. L.; SPECIAN, A. F. L.; SERPELONI, J. M.; DE OLIVEIRA, M. T.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. S. Phytochemical study and evaluation of cytotoxicity, mutagenicity, cell cycle kinetics and gene expression of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. in HepG2 cells *in vitro*. **Cytotechnology**, v. 70, n. 2, p. 713-728, 2018.

RIBEIRO, M. *Agrimonia eupatoria* L.: Atividade farmacológica e interações medicamentosas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. SPE, p. 321-330, 2017.

RODRIGUES, E. D. M.; QUEIROZ, R. T. D.; SILVA, L. P. D.; MONTEIRO, F. K. D. S.; MELO, J. I. M. D. Fabaceae em um afloramento rochoso no Semiárido brasileiro. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

RODRIGUES, F. G. F.; BRIZOLA, A. Low frequency radiation and possible harmful influence on biological systems. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 41, n. 3, 2019.

ROY, D. N. **Terpenoids against human diseases**. CRC Press, 2019.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007.

SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, V. S. E.; CHANDRASHEKAR, K. S.; SHASTRY, S. C. *In vivo* study for anti-inflammatory activity of *Bauhinia variegata* L. leaves. **Pharmaceutical Crops**, v. 2, n. 1, 2011.

SALATINO, A.; BLATT, C. T.; SANTOS, D. Y. D.; VAZ, A. M. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 1, p. 17-20, 1999.

SALTVEIT, M. E. Síntese e metabolismo de compostos fenólicos. **Fitoquímicos de Frutas e Vegetais: Química e Saúde Humana, 2 Volumes**, v. 115, 2017.

SANDERS, R. A.; RAUSCHER, F. M.; WATKINS III, J. B. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 143-149, 2001.

SANTANA, D. F. Y.; LIRA, M. D. A.; SANTOS, M. V. F. D.; FERREIRA, M. D. A.; SILVA, M. J. D. A.; MARQUES, K. A.; SANTOS, D. C. D. Caracterização da caatinga e da dieta de novilhos fistulados, na época chuvosa, no semiárido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 69-78, 2011.

SANTOS, F. J. B.; MOURA, D. J.; PERES, V. F.; DE MOURA SPEROTTO, A. R.; CARAMÃO, E. B.; CAVALCANTE, A. A. D. C. M.; SAFFI, J. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 474-482, 2012.

SANTOS, M.; FORTUNATO, R. H.; SPOTORNO, V. G. Analysis of flavonoid glycosides with potential medicinal properties on *Bauhinia uruguayensis* and *Bauhinia forficata* subspecies *pruinosa*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 17, p. 2574-2578, 2019.

SANTOS, M.; TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, F. R. D. S.; LIMA, W. G.; FERRAZ, A. C.; SILVA, N. L.; DE MAGALHÃES, J. C. *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. leaves-derived extracts as potent anti-dengue serotype 2. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2019.

SAS, K.; SZABÓ, E.; VÉCSEI, L. Mitochondria, oxidative stress and the kynurenine system, with a focus on ageing and neuroprotection. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 191, 2018.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

- SHREEDHARA, C. S.; VAIDYA, V. P.; VAGDEVI, H. M.; LATHA, K. P.; MURALIKRISHNA, K. S.; KRUPANIDHI, A. M. Screening of *Bauhinia purpurea* Linn. for analgesic and anti-inflammatory activities. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 75, 2009.
- SILVA, A. C. C.; OLIVEIRA, D. G. POPULATION STRUCTURE AND SPATIAL DISTRIBUTION OF *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. IN TWO FRAGMENTS AT DIFFERENT REGENERATION STAGES IN THE CAATINGA, IN SERGIPE, BRAZIL. **Revista Árvore**, v. 39, n. 3, p. 431-437, 2015.
- SILVA, A. M. A.; DA SILVA, H. C.; MONTEIRO, A. O.; LEMOS, T. L. G.; DE SOUZA, S. M.; SANTOS, H. V.; SANTIAGO, G. M. P. Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activities of the leaf essential oil of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 369-373, 2020.
- SILVA, F. R. M. B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A. V.; DE SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 33-37, 2002.
- SILVA, J. V.; LOPES, C. R. A. S.; MARTINS, J.; DA AMAZÔNIA MERIDIONAL, C. D. H. Contribuição taxonômica ao estudo do gênero *Bauhinia* L. (Leguminosae) no estado de Mato Grosso, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, p. 307-314, 2016.
- SILVA, K. L.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, n. 5-6, p. 478-480, 2000.
- SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. D.; SANTOS, B. C. *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, V. 9, n. 3, p. 161-252, 2015.
- SILVA, M. A. B. D.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M. D.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. D. O.; SILVA, R. M. D. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.
- SILVA, M. G. G.; DE SANTANA, E. R. B.; DOS SANTOS PADILHA, R. J.; DE ANDRADE LIMA, C. S.; YARA, R. Atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos bioativos da espécie do semiárido *Bauhinia cheilantha* (bong.) Steud. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 96-97, 2017.
- SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 93-114, 2013.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S.M.S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015.

SINGH, R. Medicinal plants: A review. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p. 50, 2015.

SINOUE, C.; FOREST, F.; LEWIS, G. P.; BRUNEAU, A. The genus *Bauhinia* sl (Leguminosae): a phylogeny based on the plastid trn L–trn F region. **Botany**, v. 87, n. 10, p. 947-960, 2009.

SOUZA, J. B. P.; ATALIBA, F. J. B.; COSTA, D. A.; FARIAS, A. D. Interações planta medicinal x medicamento convencional no tratamento da hipertensão arterial. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 2, p. 90-9, 2017.

SOUZA, J. T.; MENDES, P. G.; SOUZA, J.; SILVA, M. A. M.; LIMA, A. S.; SOUZA, M. M. A. Caracterização de uma caatinga arbórea no município de Aiuaba-CE. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 1, n. 1, 2007.

SOUZA, Z. N.; BARROS, B. R. S.; SILVA, K. S.; SILVA, R. S. MELO, C. M. L. PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO NORDESTE DO BRASIL: UMA REVISÃO DE LITERATURA. I Congresso Internacional das Ciências da Saúde, COINTER – PDVS, 2019.

SULSEN, V. P.; CAZORLA, S. I.; FRANK, F. M.; LAURELLA, L. C; MUSCHIETTI, L. V.; CATALAN, C. A.; MALCHIODI, E. L. Natural terpenoids from *Ambrosia* species are active *in vitro* and *in vivo* against human pathogenic trypanosomatids. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2494, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Universitat Jaume I, 2006.

TEIXEIRA, D. C.; FARIAS, D. F.; CARVALHO, A. F. U.; ARANTES, M. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Chemical composition, nutritive value, and toxicological evaluation of *Bauhinia cheilantha* seeds: a legume from semiarid regions widely used in folk medicine. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

TEIXEIRA, J. B. P.; DOS SANTOS, J. V. **Fitoterápicos e Interações Medicamentosas**. UFJF. 2011.

TORRES-COLÍN, R.; DUNO DE STEFANO, R.; LORENA CAN, L. El género *Bauhinia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cercideae) en la península de Yucatán (México, Belice y Guatemala). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 80, n. 2, p. 293-301, 2009.

TUNG MUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

UMENO, A.; BIJU, V.; YOSHIDA, Y. *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. **Free Radical Research**, v. 51, n. 4, p. 413-427, 2017.

VALKO, M.; RHODES, C.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M. M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 575-587, 2008.

VIJAYAKUMARI, K.; SIDDHURAJU, P.; JANARDHANAN, K. Chemical composition, amino acid content and protein quality of the little-known legume *Bauhinia purpurea* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, n. 3, p. 279-286, 1997.

WATSON, R. R. **Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation**. Academic Press, 2018.

WINK, M.; SCHIMMER, O. Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. **Annual Plant Reviews online**, p. 21-161, 2018.

ZAKARIA, Z. A.; HISAM, E. A.; ROFIEE, M. S.; NORHAFIZAH, M.; SOMCHIT, M. N.; TEH, L. K.; SALLEH, M. Z. *In vivo* antiulcer activity of the aqueous extract of *Bauhinia purpurea* leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 2, p. 1047-1054, 2011.

**Artigo I – Extrato aquoso foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steude
(Leguminosae): antioxidante natural não citotóxico**

Manuscrito a ser submetido ao Periódico JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY
(Fator de Impacto: 3.690; Qualis A2)

ARTIGO I: Extrato aquoso foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steude (Leguminosae): antioxidante natural não citotóxico

Palloma Lima de Oliveira¹; José Rafael da Silva Araújo¹; Camila Marinho da Silva¹; Silvany de Sousa Araújo¹; Kyria Cilene de Andrade Bortoleti²; Márcia Vanusa da Silva³; Dráulio Costa da Silva⁴; Ana Paula de Oliveira⁵; Ana Christina Brasileiro-Vidal¹.

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Laboratório de Citogenética/NECMOL, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

³Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Laboratório de Bioquímica/NECMOL, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

⁵Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais/NEPLAME, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Relevância etnofarmacológica: *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steude (Leguminosae), denominada popularmente pata-de-vaca ou mororó, tem sido utilizada na medicina popular como antidiabética, anti-inflamatória e sedativa. Contudo, não há estudos relacionados aos potenciais antioxidante e citotóxico de seu extrato aquoso foliar.

Objetivo do estudo: Caracterizar qualitativamente a presença de compostos secundários em dois tipos de extratos aquosos foliares de *B. cheilantha* (não delipidado e delipidado), avaliar o potencial antioxidante e investigar os seus possíveis efeitos citotóxicos.

Materiais e métodos: A caracterização fitoquímica dos extratos foi realizada por cromatografia em camada delgada e o potencial antioxidante foi determinado pelos métodos de DPPH (1,56 a 200 µg/mL), ABTS (3,12 a 50,0 µg/mL) e fosfomolibdênio (12,5 a 100 µg/mL). A citotoxicidade foi realizada com o ensaio do MTT em células de fibroblastos da linhagem L929 em concentrações de 1,56 a 1.600 µg/mL.

Resultados: Os extratos apresentaram os metabólitos secundários: antocianinas, compostos fenólicos, derivados antracênicos, ligninas, saponinas e taninos hidrolisáveis. Ambos apresentaram potencial antioxidante, com efeitos dose-dependentes, não havendo diferenças significativas entre os três métodos testados. No ensaio DPPH, o não delipidado e o delipidado mostraram EC₅₀ de 25,84 e 26,19 µg/mL, respectivamente; no ABTS, o EC₅₀ foi de 13,60 (não delipidado) e 16,34 µg/mL (delipidado), enquanto no teste de fosfomolibdênio, observou-se EC₅₀ de 66,09 (não delipidado) e 52,78 µg/mL (delipidado). Os extratos aquosos de *B. cheilantha* não foram citotóxicos, exceto para a concentração mais alta do não delipidado (1.600 µg/mL) e para as duas concentrações mais altas do extrato delipidado (800 e 1.600 µg/mL).

Conclusões: Os extratos foliares aquosos de *B. cheilantha* exibem potencial antioxidante promissor para tratamentos de doenças causadas por radicais livres, com ausência de citotoxicidade para as concentrações antioxidantes sugeridas, confirmando o seu potencial como fonte natural de recursos terapêuticos.

Palavras-chave: Pata-de-vaca. Compostos secundários. Radicais livres. MTT. Células de fibroblasto

1 Introdução

O estresse oxidativo é resultante do excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) no organismo, proveniente do desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes (Sies, 2015). Tal estresse pode contribuir para a degeneração de estruturas vitais para a sobrevivência celular, mediante danos no DNA e oxidação de lipídeos e proteínas, bem como favorecer o desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como as doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e senescência celular precoce (Li et al., 2015).

Os antioxidantes podem ser produzidos intracelularmente ou adquiridos por vias exógenas, mediante o consumo de produtos de origem vegetal, por exemplo. As plantas medicinais são consideradas importantes fontes de antioxidantes no combate aos radicais livres por apresentarem uma grande diversidade e quantidade de componentes bioativos, os quais agem isolada ou conjuntamente. Dentre os antioxidantes exógenos, destacam-se os metabólitos secundários, como compostos fenólicos e carotenoides, e as vitaminas A, C e E (Baiano e Del Nobile, 2016; Manach et al., 2004; Zhang et al., 2016). Esses componentes bioativos podem atuar em sinergismo com medicamentos sintéticos, aumentando sua eficácia (Chen et al., 2019; Dil et al., 2020), fato que tem chamado a atenção da indústria farmacêutica.

Além das propriedades biológicas benéficas, os metabólitos secundários podem causar efeitos tóxicos, sendo recomendada a realização de testes de segurança química para validação e uso dos fitoquímicos com fins medicinais (Verri et al., 2017). Para analisar os efeitos toxicológicos, ensaios *in vivo* ou *in vitro* são requeridos por agências internacionais (Stange et al., 2008), como *Food and Drug Administration* (FDA, 2010), *European Medicines Agency* (EMA, 2013), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2016) e, a brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014).

Testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios a serem realizados visando ao estabelecimento dos limites de concentração para os testes *in vitro* pré-clínicos (Akhtar et al., 2016; Araújo et al., 2015). Avaliam o potencial de um composto candidato produzir danos na função de organelas ou estruturas vitais para as células ou induzir interferência no ciclo mitótico. Dentre os testes de citotoxicidade, destaca-se o teste de viabilidade celular do MTT [brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio], recomendado pela ISO 10993-5-2009, que se baseia na atividade da

enzima mitocondrial desidrogenase succínica, a qual cliva o MTT em células viáveis, produzindo os cristais de formazan que são insolúveis e apresentam coloração violeta, diferenciando-as das células inviáveis (Araújo et al., 2015).

Bauhinia cheilantha (Bongard) Steude (Leguminosae), considerada endêmica da Caatinga e conhecida popularmente como pata-de-vaca ou mororó, destaca-se por seu uso na medicina popular (Cartaxo et al., 2010; Cavalcante et al., 2020; Teixeira et al., 2013). Suas folhas apresentam óleo essencial de comprovado potencial larvicida contra o *Aedes aegypti* (Silva et al., 2020). Adicionalmente, trabalhos anteriores reportaram o valor proteico e potencial hipoglicemiante e antitumoral de folhas e sementes de *B. cheilantha* (Silva et al., 2020; Silva e Cechinel Filho, 2002; Teixeira et al., 2013), enquanto ações anti-inflamatória, antidiabética e sedativa foram relatadas para seu extrato etanólico foliar (Almeida et al., 2005; Alves Martins et al., 2015). Contudo, investigações relacionadas ao potencial antioxidante e efeito citotóxico do extrato aquoso são inexistentes, sendo tal análise importante visto que a infusão é a sua forma mais utilizada na medicina popular (Camparoto et al., 2002; Marques; Farah, 2009). Desse modo, o presente trabalho visou: (1) caracterizar qualitativamente a presença de metabólitos secundários em dois tipos de extratos aquosos foliares de *B. cheilantha*; (2) avaliar o potencial antioxidante e (3) investigar os efeitos citotóxicos em células de fibroblastos de camundongo (linhagem L929).

2 Materiais e Métodos

2.1 Obtenção do material vegetal

Folhas de *B. cheilantha* foram coletadas no *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF (9°19'79.1" S; 040° 33'37.1" W, Petrolina, Brasil), inserido em área do bioma Caatinga, durante a estação chuvosa (Maio/2019). A espécie foi identificada e uma exsicata depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF, Petrolina – PE, Brasil), sob o tombo 23798.

2.2 Processamento do material vegetal e preparação dos extratos aquosos foliares de *B. cheilantha*

Folhas de *B. cheilantha* foram secas em estufa à 37 °C, por aproximadamente 24 h. O material vegetal seco foi triturado e submetido ao moinho de facas (Marconi),

para obtenção de um pó fino utilizado para a obtenção de dois extratos aquosos foliares, submetidos ou não ao processo de delipidação.

Para o extrato não delipidado, 50 g do pó foram adicionados em 550 mL de água destilada fervendo sob constante agitação. Após homogeneização, o recipiente foi tampado por 15 min para o processo de infusão. Após esfriar, o extrato foi filtrado e centrifugado por três vezes a 4000, 4500, 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi submetido a duas filtrações, consecutivamente, utilizando funil de Buchner com placa de vidro sinterizada 3G. Após liofilização, obteve-se 4,46 g de material (rendimento de 8,92%), que foi mantido a 4 °C para os testes posteriores.

Para o extrato delipidado, 100 g do pó foram mantidos em contato com 140 mL de clorofórmio para o processo de delipidação sob refluxo em extrator Soxhlet à 60 °C durante 17 h. Em seguida, o pó foi seco em estufa à 37 °C e realizado o processo de infusão de 50 g do pó em 550 mL de água destilada, de acordo com o descrito para o extrato não delipidado. Após a liofilização, obteve-se 3,71 g de material (rendimento de 7,42%).

2.3 Caracterização fitoquímica dos extratos aquosos foliares de *B. cheilantha*

Para determinar qualitativamente a presença dos metabólitos secundários, os extratos de *B. cheilantha* foram solubilizados individualmente em clorofórmio. Uma alíquota de cada amostra solubilizada foi submetida à análise em placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Silicycle TLC – Aluminum F254) e eluídas com diferentes sistemas de solventes, conforme Wagner e Bladt (1996) (Tabela 1).

2.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

2.4.1 Ensaio DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

A atividade antioxidante por captura do radical de DPPH foi avaliada para oito concentrações dos extratos não delipidado e delipidado diluídas em etanol (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL), seguindo o protocolo descrito por Wróblewska et al. (2019), com algumas modificações. Foram adicionados 50 µL de cada concentração em 100 µL de solução etanólica de DPPH• (200 µM) em triplicatas. O controle negativo consistiu em apenas DPPH• e a solução etanólica, enquanto os controles positivos foram a quercetina e o ácido ascórbico nas concentrações 0,78;

1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0 e 50 µg/mL e 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1

Sistemas eluentes e reveladores utilizados para análise do perfil fitoquímico dos extratos aquosos foliares de *Bauhinia cheilantha*.

Metabólitos Secundários	Sistemas Eluentes	Reveladores
Alcaloides gerais	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Vanilina sulfúrica 10 min a 100°C
Antraquinonas	Éter de petróleo: acetato de etila: ácido fórmico (75:25:1)	-
Compostos fenólicos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Folin ciocalteu
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1, saturado com ácido acético 10%)	Vanilina sulfúrica 10 min a 100°C
Derivados antracênicos	Acetato de atila: metanol: água (100:13,5:10)	Vanilina sulfúrica 10 min a 100°C
Ligninas	Clorofórmio: metanol: água (70:30:4)	Vanilina fosfórica 5-10 min a 100°C
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina Sulfúrica 10 min a 100°C
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99:1)	KOH etanólico 10%
Saponinas	Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8)	Vanilina Sulfúrica 10 min a 100°C
Taninos condensados	Acetato de etila: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (100:11:11:26)	Vanilina clorídrica 5-10 min a 100°C
Taninos hidrolisáveis	n-Butanol: acetona: tampão fosfato pH 5,0 (40:50:10)	Sulfato ferroso amoniacal 1%
Triterpenos e esteroides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lieberman-Burchard 5-10 min a 110°C
Xantinas	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Dragendorf

As amostras foram homogeneizadas por 30 min e mensuradas as absorbâncias em espectrofotômetro a 515 nm. A porcentagem de redução do DPPH, que indica a ação antioxidante, foi estabelecida de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de redução do radical livre DPPH: } \frac{Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra}}{Abs \text{ controle}} \times 100$$

Os resultados da porcentagem foram calculados pela EC₅₀ (concentração do composto que causa 50% de redução dos radicais de DPPH) mediante plotagem das porcentagens de reduções para concentrações correspondentes (Chen et al., 2013).

2.4.2 Ensaio ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]

O ABTS foi realizado segundo Rasesa et al. (2019), com algumas alterações. Uma diluição seriada em etanol foi realizada para ambos os extratos, obtendo-se as concentrações 3,12; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL utilizadas na etapa de estabilização do radical ABTS. Como controle negativo foi utilizado apenas o ABTS diluído em solução etanólica; e como controles positivos, a quercetina e o ácido ascórbico (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 µg/mL e 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 µg/mL, respectivamente).

A solução etanólica de ABTS ajustada ao experimento (210 µM) foi preparada a partir de uma solução de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM. A cada 1 mL desta solução foram adicionados 33 mL de etanol e, em seguida, a leitura da absorbância foi ajustada para 0,70 nm ± 0,20 nm. Posteriormente, 20 µL do material teste da diluição seriada foi adicionado em 220 µL de ABTS. Após 6 min de reação, foi identificada a mudança de coloração (verde para transparente), sendo realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 734 nm. A porcentagem de inibição do radical ABTS, que indica a ação antioxidante, seguiu a fórmula:

$$I (\%): \frac{Abs\ controle - Abs\ amostra}{Abs\ controle} \times 100$$

Os resultados da porcentagem foram calculados pela EC₅₀ (concentração efetiva em 50% dos radicais livres) mediante plotagem das porcentagens de reduções em função das concentrações correspondentes.

2.4.3 Ensaio do fosfomolibdênio

O teste do fosfomolibdênio foi realizado de acordo com Popović-Djordjević et al. (2019), com algumas modificações, mediante redução do complexo fosfomolibdênio [fosfato de sódio (28 mM), molibdato de amônio (4 mM) e ácido sulfúrico (0,6 M)]. Como controle negativo foi utilizado fosfomolibdênio com água destilada e os controles positivos foram a quercetina e o ácido ascórbico (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL e 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0 µg/mL, respectivamente). Para ambos os extratos, foram realizadas diluições seriadas em água destilada, obtendo-se as concentrações 12,5; 25,0; 50,0; 100 µg/mL, testadas em triplicata.

Em microtubos, foram adicionados 1000 µL da solução de fosfomolibdênio e 100 µL das soluções dos extratos e incubados em banho-Maria a 95°C por 90 min. Posteriormente, a leitura das absorbâncias foi realizada a 695 nm. Os resultados das absorbâncias foram calculados pela EC₅₀ (concentração efetiva em que a absorbância é 0,5 nm).

2.5 Análise da citotoxicidade

O ensaio de MTT foi realizado utilizando a linhagem celular L929, oriundas de fibroblastos de camundongo, cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). As células foram descongeladas e mantidas em meio de cultura DMEM, suplementados com Soro Bovino Fetal (10%), antibiótico/ antimicótico (penicilina/ estreptomicina), a 37 °C com 5% de CO₂.

O teste de MTT seguiu o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações, e as concentrações foram baseadas no melhor desempenho de seu potencial antioxidante. Células L929 (2x10⁵ células/poço) foram semeadas em placas com 96 poços, contendo meio DMEM (100 µL/ poço) e incubados por 24 h a 37° C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Em seguida, os extratos foram diluídos em meio DMEM, utilizando as concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50;100; 200; 400; 800 e 1.600 µg/mL de ambos os extratos e filtrados a 22 µm de diâmetro. Foram adicionados 100 µL na placa de 96 poços, bem como o meio de cultura DMEM (controle negativo) e Triton X-100 1,5% (controle positivo), e incubadas à 37° C com 5 % de CO₂ por 24 h. Após o tempo de exposição, 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL) (Nº CAS 298-931, Sigma) foram adicionados em todos os poços e incubados por 3 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan dissolvidos com 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura das absorbâncias foi realizada a 570 nm.

2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Para calcular o EC₅₀ do teste antioxidante foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0. Para a comparação do EC₅₀ dos testes antioxidantes e da viabilidade celular, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade foi testada por ANOVA e teste de Levene. Após esta análise, o Teste-T (paramétrico) e o Mann-

Whitney (não paramétrico) foi aplicado para avaliar o EC₅₀ e a citotoxicidade, respectivamente, mediante o software Statistica 8.0 ($p < 0,05$).

3 Resultados

3.1 Perfil fitoquímico

A análise fitoquímica por CCD revelou que ambos os extratos de *B. cheilantha* foram fortemente positivos para a presença de derivados antracênicos e de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, e moderadamente positivos para a presença de ligninas e taninos hidrolisáveis (ambos compostos fenólicos) e saponinas (triterpenos), não sendo detectadas diferenças quanto aos metabólitos encontrados nos extratos foliares de *B. cheilantha* submetidos ou não a delipidação.

3.2 Atividade antioxidante

No DPPH, o extrato não delipidado e o delipidado mostraram EC₅₀ de $25,84 \pm 1,11 \mu\text{g/mL}$ e $26,19 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$, enquanto os padrões quercetina e ácido ascórbico apresentaram EC₅₀ de $13,57 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$ e $6,40 \pm 1,30 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2). A atividade sequestrante dos radicais variou de 2,22 a 71,11% e 2,18 a 81,15% para o não delipidado e o delipidado, respectivamente (Apêndice A). No ABTS, o EC₅₀ foi de $13,60 \pm 1,24 \mu\text{g/mL}$ e $16,34 \pm 1,26 \mu\text{g/mL}$ para o extrato não delipidado e delipidado, respectivamente, enquanto os padrões quercetina e o ácido ascórbico apresentaram EC₅₀ de $12,15 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$ e $5,48 \pm 1,26 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2). O sequestro dos radicais livres variou de 5,55 a 89,40%, para o não delipidado, e de 16,73 a 92,06%, para o delipidado (Apêndice A). No fosfomolibdênio, observou-se EC₅₀ de $66,09 \pm 1,35$ (não delipidado) e $52,78 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$ (delipidado), assim como de $26,71 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$ (quercetina) e $12,70 \pm 1,89 \mu\text{g/mL}$ (ácido ascórbico) (Tabela 2; Apêndice A).

Nos três métodos avaliados, ambos os extratos apresentaram efeitos antioxidantes dose-dependentes, notando-se que quanto maior a concentração do extrato testado, maior o sequestro dos radicais livres (Apêndice A). Também não houve diferenças significativas entre ambos os extratos quanto ao potencial de ação antioxidante.

Tabela 2

Efeito oxidante *in vitro* dos extratos aquosos foliares de *Bauhinia cheilantha* com e sem o processo de delipidação, expressado pela EC₅₀.

Material	DPPH ^A	ABTS ^A	Fosfomolibdênio ^B
	(µg/mL)		
Extrato não delipidado	25,84 ± 1,11 a	13,60 ± 1,24 a-b	66,09 ± 1,35 a
Extrato delipidado	26,19 ± 1,12 a	16,34 ± 1,26 a	52,78 ± 1,29 b
Quercetina	13,57 ± 1,19 b	12,15 ± 1,16 b	26,71 ± 1,29 c
Ácido Ascórbico	6,40 ± 1,30 c	5,48 ± 1,26 c	12,70 ± 1,19 d

^A Concentração efetiva em que ocorre 50% de redução dos radicais. ^B Concentração efetiva para absorbância de 0,5 nm. Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste paramétrico Teste-T.

3.3 Citotoxicidade

Os resultados obtidos no MTT mostraram ausência de citotoxicidade para as concentrações testadas do extrato não delipidado (Fig. 1A), com exceção da concentração de 1.600 µg/mL, que apresentou redução significativa na viabilidade celular para 85,33%. As demais alterações mostraram aumento ou manutenção da viabilidade celular quando comparado ao controle negativo. Por outro lado, o extrato delipidado apresentou efeito citotóxico (viabilidade celular abaixo de 80%) apenas para as duas maiores concentrações 800 µg/mL (74,22%) e 1.600 µg/mL (72,28%), observando-se aumento da viabilidade celular para as concentrações de 1,56; 3,12; 12,5 µg/mL quando comparadas com o controle negativo ($p < 0,05$) (Fig. 1B). Todas as concentrações de ambos os extratos apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo.

4 Discussão

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que *B. cheilantha* pode ser apontada como uma fonte natural de recursos terapêuticos, possuindo potencial antioxidante promissor para tratamentos de doenças influenciadas e/ou causadas por diferentes radicais livres. A atividade antioxidante dos dois extratos aquosos foliares de *B. cheilantha* foi confirmada pelos três métodos utilizados no presente trabalho, não sendo observada influência do processo de delipidação.

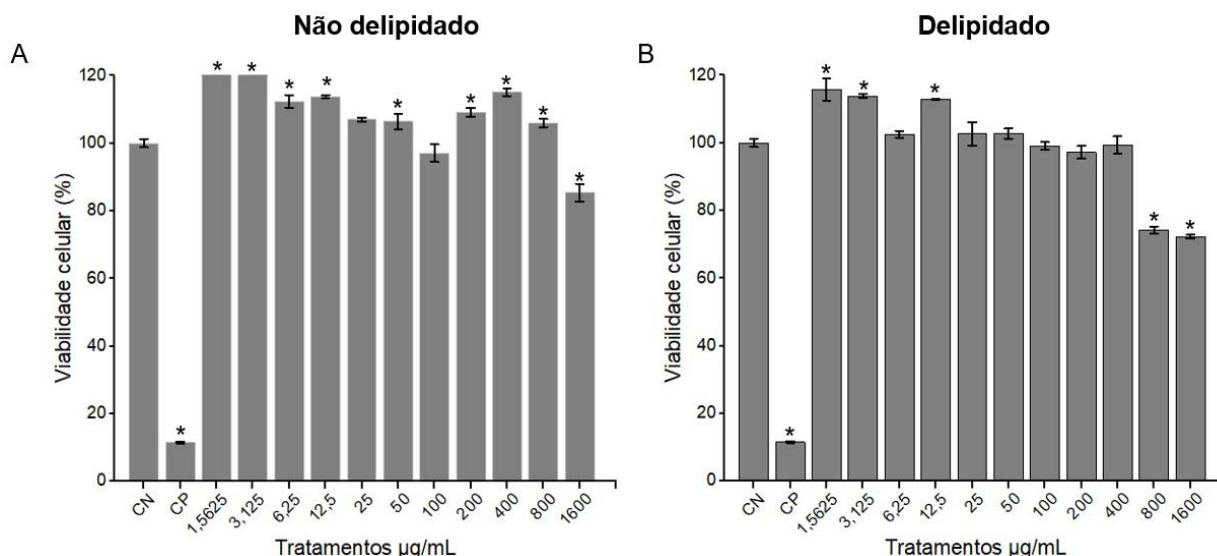


Fig. 1. Avaliação da viabilidade celular em linhagem de fibroblastos L929 de camundongo mediante o ensaio de MTT nos extratos aquosos foliares de *B. cheilantha*: **(A)** sem o processo de delipidação, e **(B)** submetido à delipidação. Os valores correspondem à média e as barras ao desvio padrão da porcentagem da viabilidade celular. CN: Controle Negativo (meio de cultura); CP: controle positivo (Triton-X 100 a 1,5%). *porcentagem média da viabilidade celular estatisticamente diferente quando comparadas com o controle negativo pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos pelos três ensaios antioxidantes corroboram o grande potencial dos extratos vegetais da espécie *B. cheilantha*, visto que cada método pode apresentar respostas variadas, a depender do tipo e forma de atuação dos radicais livres, bem como da concentração e do tempo necessário para inibir uma determinada concentração de ROS (Santos-Sánchez et al., 2019). Entre os ensaios mais eficazes para análise de potencial antioxidante, destaca-se o DPPH, cujo radical é neutralizado por redução a partir da doação de hidrogênios por antioxidantes, formando moléculas de DPPH estáveis e reduzidas (Argolo et al., 2004). Por outro lado, tanto o teste de ABTS quanto o fosfomolibidênio permitem determinar a capacidade antioxidante de componentes hidrofílicos e lipofílicos de amostras complexas (Aguilar et al., 2013; Kumar et al., 2018; Paula et al., 2014). No presente estudo, os três testes indicaram atividade antioxidante para ambos os extratos foliares de *B. cheilantha* quando comparados aos controles positivos quercetina e ácido ascórbico, mostrando valores de EC_{50} semelhantes ($13,60 \pm 1,24$ e $16,34 \pm 1,26$) à quercetina ($12,15 \pm 1,16$) no ensaio ABTS.

Nossos dados corroboram resultados anteriores para extratos foliares de outras espécies *Bauhinia*, em que a propriedade antioxidante tem sido considerada uma característica marcante (Golwala et al., 2020; Kumar et al., 2019; Vyas e Braganza,

2019). Atividade antioxidante foi relatada previamente para o extrato metanólico de *B. galpinii* N.E.Br. (EC_{50} 31,73 μ g/mL) pelo teste do DPPH (Aderogba et al., 2007) e para o etanólico de *B. glabra* Jacq. (EC_{50} 37,54 μ g/mL) pelo ensaio do fosfomolibdênio (Campos et al., 2014). Em análises de extratos brutos e diferentes frações de *B. bowkeri* Harv., *B. galpinii*, *B. petersiana* Peters e *B. variegata* usando o teste de ABTS, foi observado que a porção solúvel em metanol da fração de butanol (EC_{50} 0,88 $\pm$ 0,18; 0,89 $\pm$ 0,04; 0,90 $\pm$ 0,09 e 1,05 $\pm$ 0,11, respectivamente) teve as melhores propriedades de redução de ABTS entre as seis frações testadas e o extrato bruto (Ahmed et al., 2012). Adicionalmente, extratos aquosos e etanólicos da raiz e da casca do caule de *B. variegata* Linn (Rajani e Ashok, 2009) também apresentaram bom potencial antioxidante pelo método do DPPH.

As propriedades antioxidantes apresentadas pelos extratos vegetais estão associadas à ação dos metabólitos secundários presentes em sua composição, principalmente ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, incluindo antocianinas (flavonoides), taninos e ligninas, além de saponinas, entre outros (Gourlay e Constabel, 2019; Kregiel et al., 2017; Mahmood et al., 2018; Santos-Sánchez et al., 2019). Nos extratos de *B. cheilantha*, as atividades antioxidantes parecem ser resultantes da presença de compostos fenólicos, como antocianinas, taninos e ligninas, além de saponinas, bem como das possíveis interações entre eles.

A produção de antocianinas e de taninos nas folhas de *B. cheilantha* parece estar relacionada à resposta das plantas aos dois estresses abióticos comuns da Caatinga: a alta incidência solar, protegendo os tecidos contra a radiação UV-B; e o estresse hídrico, decorrente de longos períodos de seca. É relatado na literatura que as antocianinas, além da capacidade antioxidante, contribuem para proteção dos tecidos contra radiação solar, proteção da autooxidação e peroxidação de lipídeos (Lopes et al., 2007; Meira et al., 2017), e estão relacionadas ao estresse hídrico (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Já os taninos hidrolisáveis podem atuar no estado pró-oxidante celular e na proteção contra raios ultravioletas (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

Nossos dados em *B. cheilantha* corroboram resultados da literatura que destacaram os compostos fenólicos do tipo flavonoide como principais metabólitos secundários em extratos foliares de espécies de *Bauhinia*, como observado para *B. forficata* (kaempferitrina; kaempferol-3-O- α -diraminosídeo), *B. reticulata* DC. (quercetina), *B. uruguayensis* Benth (quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo;

kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo), *B. megalandra* Griseb (5,7,5'-tri-hidroxi-2'-O-ramnosil-flavona; 5,7,2'-trihidroxi-5'-O-ramnosil-flavona). Por outro lado, predominância de compostos sesquiterpenoides (grupo dos terpenos) foi observada no óleo essencial de 10 espécies de *Bauhinia*, incluindo *B. cheilantha* (78,59%) (Silva et al., 2020). Compostos sesquiterpenoides não foram detectados nos extratos avaliados no presente estudo, os quais apresentaram composição dos metabólitos semelhantes, tanto na presença quanto na ausência de lipídeos.

Na análise da citotoxicidade dos extratos foliares aquosos de *B. cheilantha*, foram notadas apenas redução da viabilidade celular para as concentrações mais altas (800 $\mu\text{g/mL}$ e/ou 1.600 $\mu\text{g/mL}$). Vale ressaltar que as concentrações com potencial antioxidante não apresentaram efeitos citotóxicos, sendo consideradas seguras para as células de fibroblastos analisadas. Pequenas diferenças do potencial citotóxico podem estar relacionadas às quantidades de metabólitos secundários e a suas interações com os componentes celulares (Wink e Schimme, 2018).

Outros extratos vegetais de *Bauhinia* também não foram citotóxicos, a exemplo dos extratos foliares aquoso e hidroetanólico de *B. galpinii*, cujas concentrações entre 25 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ não afetaram a viabilidade celular da linhagem Vero, pelo teste de MTT (Erhabor et al., 2020). Por outro lado, analisando-se os compostos flavonoides isolados das folhas de *B. galpinii*, o glicosídeo flavonoide miricetina-3-O-galactopiranosídeo apresentou citotoxicidade na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (46%), enquanto que a quercetina-3-O-galactopiranosídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$ propiciou uma sutil proliferação celular (118%) (Aderogba et al., 2007). Ação citotóxica dose-dependente também foi identificada para o extrato etanólico e para a fração etérea de *B. platypetala* (Burch. ex Benth.) sobre a linhagem celular V79, sugerindo-se que o efeito citotóxico estaria atrelado à presença do composto ácido hexadecanoico (ácido palmítico) (Santos et al., 2012).

A elevada capacidade antioxidante associada à sua composição fitoquímica e ausência de citotoxicidade nas concentrações com potencial antioxidante dos extratos foliares de *B. cheilantha* em células de fibroblastos L929 sugerem que este recurso vegetal apresenta potencial terapêutico contra doenças associadas ao estresse oxidativo. Testes pré-clínicos adicionais são necessários para validar sua segurança de uso.

5 Conclusões

Os extratos aquosos foliares de *B. cheilantha* apresentam grande potencial antioxidante. Tal efeito pode ser devido à presença dos metabólitos secundários encontrados e suas interações entre eles, com destaque para os compostos fenólicos do tipo antocianinas e para os taninos hidrolisáveis, ligninas e saponinas. Ambos os extratos delipidado e não delipidado não mostram diferenças quanto à sua composição química e ao potencial antioxidante revelados pelos métodos de DPPH, ABTS e fosfomolibdênio.

As concentrações com potencial antioxidante não apresentam citotoxicidade para as células de fibroblastos de camundongos testadas, observando-se citotoxicidade apenas para as duas maiores concentrações (800 e 1600 µg/mL) do extrato delipidado e para a maior do não delipidado. Embora esses extratos não apresentem diferenças quanto a sua composição química, diferenças nas quantidades e nas interações entre os metabólitos secundários podem justificar as pequenas divergências notadas.

O extrato aquoso foliar de *B. cheilantha* representa uma fonte natural de recursos terapêuticos, possibilitando o auxílio no tratamento de doenças associados ao estresse oxidativo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro mediante aprovação de bolsa de pesquisa, ao Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (Departamento de genética), Laboratório de Biologia Molecular (Departamento de bioquímica) e ao Laboratório de Recursos Naturais (Departamento de bioquímica) (UFPE), por oferecerem a infraestrutura necessária para execução dos experimentos, e ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), por ceder células da linhagem celular L929, oriundas de fibroblastos de camundongo.

Referências

- Aderogba, M.A., McGaw, L.J., Ogundaini, A.O., Eloff, J.N., 2007. Antioxidant activity and cytotoxicity study of the flavonol glycosides from *Bauhinia galpinii*. *Natural Product Research*. 21, 7, 591-599. <https://doi.org/10.1080/14786410701369557>
- Aguilar, U.M., Pineda P.M., Prieto, P., 2013. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. *Biochemistry*. 337. <http://hdl.handle.net/10396/10963>
- Ahmed, A.S., Elgorashi, E.E., Moodley, N., McGaw, L.J., Naidoo, V., Eloff, J.N., 2012. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. *Journal of Ethnopharmacology*. 143, 3, 826-839. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.004>
- Akhtar, M.F., Saleem, A., Sharif, A., Akhtar, B., Nasim, M.B., Peerzada, S., Ali, S., 2016. Genotoxic and cytotoxic action potential of *Terminalia citrina*, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. *Jornal EXCLI*. 15, 589.
- Almeida, C.F.C.B.R., Silva, T.D.L., Amorim, E.L.C., Maia, M.D.S., De Albuquerque, U.P., 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments*. 62, 1, 127-142. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.09.020>
- Alves Martins, J.J., Cordeiro, S.F., Trindade, R.A.P., Nobre, M.J., Palmeira Gomes, J., 2015. Study of the drying kinetics of leaves *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (mororó). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 20, 4, 397-408.
- ANVISA, Agência de Vigilância Sanitária (Brasil), 2014. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, de 13 de maio de 2014. Resolução RE 90, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília. 2–5.
- Araújo, S.D.S., Fernandes, T.C., Marin-Morales, M.A., Brasileiro-Vidal, A.C., Benko-Iseppon, A.M., 2015. Mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity assays of medicinal plants: first step for drug development. *Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market*, 130-153.
- Argolo, A.C.C., Sant'ana, A.E.G., Pletsch, M., Coelho, L.C.B.B., 2004. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*. 95, 2, 229-233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.014>
- Baiano, A., Del Nobile, M.A., 2016. Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56, 12, 2053-2068. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.812059>
- BCRJ. Banco de células do Rio de Janeiro. Caracterização das culturas celulares. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.nce.ufrj.br/bcrj/Joomla_busca1.asp?bcrj=0188>. Acesso em 11. Abr. 2020.

- Camparoto, M.L., Teixeira, R.D.O., Mantovani, M.S., Vicentini, V.E.P., 2002. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*. 25, 1, 85-89.
- Campos, R., De Oliveira, V.B., Paula, C.D.S., Pontarolo, R., Dias, J.D.F.G., Miguel, M.D., Zanin, O.G.M., 2014. Multivariate analysis between the phytochemical features and antioxidant properties of the stems of *Bauhinia glabra* Jacq. (FABACEAE). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6, 8, 151-155.
- Cartaxo, S.L., De Almeida Souza, M.M., De Albuquerque, U.P., 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 131, 2, 326-342. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.003>
- Cavalcante, W.F., Silva, L.R.C.D., Silva, E.G.D., Oliveira, J.T.C., Moreira, K.A., 2020. Enzymatic activity of caatinga biome with and without anthropic action¹. *Revista Caatinga*. 33, 1, 142-150. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n116rc>
- Chen, L., Wang, D., Diya, L.V., Wang, X., Liu, Y., Chen, X., Chai, Y., 2019. Identification of eupatilin and ginkgolide B as p38 ligands from medicinal herbs by surface plasmon resonance biosensor-based active ingredients recognition system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 171, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.029>
- Chen, Z., Bertin, R., Frolidi, G., 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*. 138, 1, 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.001>
- Dil, E.A., Asfaram, A., Goudarzi, A., Zabihi, E., Javadian, H., 2020. Biocompatible chitosan-zinc oxide nanocomposite based dispersive micro-solid phase extraction coupled with HPLC-UV for the determination of rosmarinic acid in the extracts of medical plants and water sample. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.132>
- EMA. European Medicines Agency, 2013. ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. Ema, London.
- Erhabor, J.O., Omokhua, A.G., Ondua, M., Abdalla, M.A., McGaw, L. J., 2020. Pharmacological evaluation of hydro-ethanol and hot water leaf extracts of *Bauhinia galpinii* (Fabaceae): A South African ethnomedicinal plant. *South African Journal of Botany*. 128, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.008>
- FDA. Food and Drug Administration, 2010. M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. EUA, Rockville.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 30, 2, 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Golwala, D.K., Vaidya, S.K., Dholwani, K.K., Patel, D.S., Sahoo, S., 2020. Antioxidant and Antimutagenic (Anticlastogenic) Activity of Alcoholic Extract of

Bauhinia variegata (Linn.) Root. Jornal Europeu de Plantas Medicinais. 32-39.
<https://doi.org/10.9734/ejmp/2020/v31i230214>

Gourlay, G., Constabel, C.P., 2019. Condensed tannins are inducible antioxidants and protect hybrid poplar against oxidative stress. *Tree physiology*. 39, 3, 345-355.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpy143>

ISO, I. 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva.

Kregiel, D., Berlowska, J., Witonska, I., Antolak, H., Proestos, C., Babic, M., Zhang, B., 2017. Saponin-based, biological-active surfactants from plants. Application and Characterization of Surfactants. 183-205. <http://dx.doi.org/10.5772/68062> 1

Kumar, A., Anand, V., Dubey, R.C., Goel, K.K., 2019. Evaluation of antioxidant potential of alcoholic stem bark extracts of *Bauhinia variegata* Linn. *Journal of Applied and Natural Science*. 11, 1, 235-239. <https://doi.org/10.31018/jans.v11i1.2015>

Kumar, S., Chaitanya, R.K., Preedy, V.R., 2018. Assessment of antioxidant potential of dietary components. In: HIV/AIDS. Academic Press, p. 239-253.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809853-0.00020-1>

Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W., Feng, Y., 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 11, 26087-26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

Lopes, T., Xavier, M., Quadri, M.G., Quadri, M., 2007. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Current Agricultural Science and Technology*. 13, 3. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.18539/CAST.V13I3.1375](http://dx.doi.org/10.18539/CAST.V13I3.1375)

Mahmood, Z., Yameen, M., Jahangeer, M., Riaz, M., Ghaffar, A., Javid, I., 2018. Lignin as Natural Antioxidant Capacity. *Lignin-Trends and Applications*; IntechOpen: London, UK. 181-205. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73284>

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79, 5, 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

Marques, V., Farah, A., 2009. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*. 113, 4, 1370-1376.

Meira, N.A.N., Pereira, N.P., Maciel, L.F., Oliveira, D.D., Nascimento, Í.S., Silva, R.A., 2017. Flavonóides e antocianinas em *Myrciaria Cauliflora* (Jabuticaba) visando à aplicabilidade cosmética. *Visão Acadêmica*. 17, 3.
<http://dx.doi.org/10.5380/acd.v17i3.48805>

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

OECD. Organisation For Economic Cooperation and Development, 2016. OECD Guideline for the testing of chemicals. 487: *in vitro* mammalian cell micronucleus test.

- Paula, C.S., Canteli, V.C.D., Hirota, B.C.K., Campos, R., De Oliveira, V.B., Kalegari, M., Miguel, M. D., 2014. Potencial antioxidante *in vitro* das folhas da *Bauhinia unguolata* L. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 35, 2.
- Popović-Djordjević, J., Cengiz, M., Ozer, M.S., Sarikurkcü, C., 2019. Calamintha incana: Essential oil composition and biological activity. Industrial Crops and Products. 128, 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.003>
- Rasera, G.B., Hilkner, M.H., De Alencar, S.M., De Castro, R.J.S., 2019. Biologically active compounds from white and black mustard grains: An optimization study for recovery and identification of phenolic antioxidants. Industrial Crops and Products, v. 135, p. 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.059>
- Rajani, G.P., Ashok, P., 2009. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. Indian Journal of Pharmacology. 41, 5, 227. 10.4103/0253-7613.58513
- Santos, F.J.B., Moura, D.J., Peres, V.F., De Moura Sperotto, A.R., Caramão, E.B., Cavalcante, A.A.D.C.M., Saffi, J., 2012. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. Journal of Ethnopharmacology. 144, 3, 474-482. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.047>
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In Antioxidants. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. Journal of Functional Foods. 18, 820-897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biology. 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Silva, A.M.A., Da Silva, H.C., Monteiro, A.O., Lemos, T.L.G., De Souza, S.M., Santos, H.V., Santiago, G.M.P., 2020. Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activities of the leaf essential oil of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. South African Journal of Botany. 131, 369-373. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.011>
- Silva, K.L., Cechinel Filho, V., 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. Química Nova. 25, 3, 449-454. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300018>
- Stange, V.S., Gomes, T.D., Andrade, M.A.D., Batitucci, M.D.C.P., 2008. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), *Cecropiaceae*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 19, 2B, 637-642. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400023>
- Teixeira, D.C., Farias, D.F., Carvalho, A.F.U., Arantes, M.R., Oliveira, J.T.A., Sousa, D.O.B., Vasconcelos, I.M., 2013. Chemical composition, nutritive value, and toxicological evaluation of *Bauhinia cheilantha* seeds: a legume from semiarid regions widely used in folk medicine. BioMed Research International. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/578781>

Verri, A.M., Moura, A.D.A., De Moura, V.M., 2017. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. *Revista UNINGÁ Review*. 30, 1, 55-61.

Vyas, P., Braganza, V.J., 2019. Effect of solvents and extraction methods on the phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of *Bauhinia variegata* and *Leptadenia reticulata*. *Jornal Asiático de Farmácia e Farmacologia*. 5, 4, 834-840. <https://doi.org/10.31024/ajpp.2019.5.4.26>

Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media.

Wink, M., Schimmer, O. 2018. Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. *Annual Plant Reviews*. 39, 21-161.
Doi:10.1002/9781119312994.apr0418

Wróblewska, K.B., Baby, A.R., Guaratini, M.T.G., Moreno, P.R.H., 2019. *In vitro* antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. *Industrial Crops and Products*. 130, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.081>

Zhang, J.J., Li, Y., Zhou, T., Xu, D.P., Zhang, P., Li, S., Li, H.B., 2016. Bioactivities and health benefits of mushrooms mainly from China. *Molecules*. 21, 7, 938. <https://doi.org/10.3390/molecules21070938>

Dados suplementares

Apêndice A

Potencial antioxidante dos extratos aquosos das folhas de *Bauhinia cheilantha* expressos em porcentagem de inibição do radical livre DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) e ABTS [(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], bem como absorbância do fosfomolibdênio.

Teste	Extrato/ composto	Concentração (µg /mL)								
		200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
DPPH	Não delipidado	71,11	72,59	39,17	43,66	14,68	12,34	8,19	2,22	-
	Delipidado	81,15	71,81	58,89	37,08	21,19	10,22	5,96	2,18	-
	Quercetina	-	-	83,98	67,70	38,61	17,85	11,23	4,48	0,04
	Ácido ascórbico	-	-	-	87,99	86,8	42,63	13,51	1,68	-
ABTS	Não delipidado	-	-	89,40	74,62	38,19	22,03	5,55	-	-
	Delipidado	-	-	92,06	75,25	40,40	23,99	16,73	-	-
	Quercetina	-	-	91,16	72,03	48,80	26,37	11,41	5,18	0,86
	Ácido ascórbico	-	-	-	-	91,25	53,33	28,87	14,40	8,56
Fosfomolibdênio	Não delipidado	-	0,79	0,34	0,25	0,18	-	-	-	-
	Delipidado	-	0,92	0,55	0,33	0,24	-	-	-	-
	Quercetina	-	-	0,95	0,46	0,33	0,22	0,16	0,14	0,12
	Ácido ascórbico	-	-	-	1,074	0,579	0,332	0,238	0,171	-

(-) concentração não avaliada para o teste bioquímico em questão.

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY



JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- Description
- Audience
- Impact Factor
- Abstracting and Indexing
- Editorial Board
- Guide for Authors



ISSN: 0378-8741

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

2019: 3.690 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
 BIOSIS
 Citation
 Index
 CAB
 Internatio
 nal
 Cambridge
 Scientific Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents -
 Life Sciences
 Embase
 International
 Pharmaceutical Abstracts
 NAPRALERT (Natural
 Products Alert) Science
 Citation Index
 PubMed/Medline

EMBiology
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

A.M. Viljoen, Tshwane University of Technology Department of Pharmaceutical Sciences, Private Bag X680, 0001, Pretoria, South Africa

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).

Associate Editor

Z. Bian, Hong Kong Baptist University, Kowloon, Hong Kong

P. Dias Fernandes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

T. Efferth, Johannes Gutenberg University Mainz Institute of Pharmacy and Biochemistry Therapeutic Life Sciences, Mainz, Germany

L.D. Kong, Nanjing University, Nanjing, China

V. Kuete, University of Dschang Department of Biochemistry, Dschang, Cameroon

M. Leonti, University of Cagliari, Cagliari, Italy

G. Lin, The Chinese University of Hong Kong School of Biomedical Sciences, Hong Kong, China

P. K. Mukherjee, School of Natural Product Studies, Department of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University, Kolkata, India

K. Shaari, Universiti Putra Malaysia Institute of Bioscience, Serdang, Malaysia

A. Shikov, Group of Scientific Research Institutes, Sankt Peterburg, Russian Federation

M. Ye, Peking University, Beijing, China

E. Yesilada, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

Managing Editors

I. Vermaak, Tshwane University of Technology Department of Pharmaceutical Sciences, Pretoria, South Africa

M. Sandasi, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa

S. Combrinck, Tshwane University of Technology Department of Pharmaceutical Sciences, Pretoria, South Africa

G. Fouche, Council for Scientific and Industrial Research, Pretoria, South Africa

Editorial Board

S. Alban, Kiel, Germany

A. Andrade-Cetto, Mexico City, Mexico

M.J. Balick, Bronx, New York, United States

R. Bauer, Graz, Austria

G. Bourdy, Cayenne, French Guiana

T. Brendler, Collingswood, New Jersey, United States

J.B. Calixto, Florianópolis, Brazil

D. C. Chattopadhyay, Indian Council of Medical Research, Kolkata, India

C-T. Che, Hong Kong, Hong Kong

G. A. Cordell, Chicago, Illinois, United States

J. Ding, Shanghai, China

V.M. Dirsch, Vienna, Austria
W. Dou, Shanghai, China
E. Elisabetsky, Porto Alegre, Brazil
J. Fleurentin, Metz, France
B.L. Furman, Glasgow, Scotland, United Kingdom
S. Gafner, Austin, Texas, United States
G. Ge, Shanghai, China
M.P. Germano, Messina, Italy
J. Gertsch, Bern, Switzerland
A.H. Gilani, Karachi, Pakistan
M.P. Gupta, Panama City, Panama
M. H. Halabalaki, Athens, Greece
A. Hensel, Münster, Germany
P.J. Houghton, London, United Kingdom
Z. Ismail, Penang, Malaysia
W. Jia, Honolulu, Hawaii, United States
T. Johns, Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canada
C.K. Katiyar, Kolkata, India
G. Kavalali, Fatih, Turkey
H-S. Kim, Cheongju, Korea, Republic of
J. Kim, Seoul, Korea, Republic of
Y. Kimura, Sendai, Japan
A. K. Kiss, Warszawa, Poland
M.A. Lacaille-Dubois, Dijon, France
Clara B. S. Lau, Hong Kong, Hong Kong
S. G. Leitão, Rio de Janeiro, Brazil
H Li, Beijing, China
A. Lu, Kowloon, Hong Kong
T. M. Makino, Nagoya, Japan
E. Matteucci, Pisa, Italy
I. Merfort, Freiburg im Breisgau, Germany
J.J.M. Meyer, Pretoria, South Africa
D.E. Moerman
D.A. Mulholland, Guildford, United Kingdom
M. R. Mustafa, Kuala Lumpur, Malaysia
A. Panthong, Chiang Mai, Thailand
B. Patwardhan, Pune, India
X. Peigen, Beijing, China
A. Pieroni, Pollenzo, Italy
P. Podlasz, Olsztyn, Poland
G. Schmeda Hirschmann, Talca, Chile
D.K. Semwal, Dehradun, Uttarakhand, India
R.B. Semwal, Dehradun, Uttarakhand, India
V.S. da Silva Bolzani, Araraquara, Brazil
D. Shi, Beijing, China
D.D. Soejarto, Chicago, Illinois, United States
E. Speroni, Bologna, Italy
C. G. L. Veale, Durban, South Africa
A. J. Vlietinck, Wilrijk-Antwerp, Belgium
H. Wagner, München, Germany

C.S. Weckerle, Zurich, Switzerland
C.W. Wright, Bradford, United Kingdom
R. Yan, Taipa, Macao
A.T. Yenesew, Nairobi, Kenya
S. Zacchino, Rosario, Argentina
Zheng, Shanghai, China

Founding Editors

J.G. Bruhn
L. Rivier, Lausanne, Switzerland

Previous Editors-in-Chief

R. Verpoorte, Leiden University Institute of Biology Leiden, Leiden, Netherlands

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. 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.

Submission checklist

Please click [here](#) to download the Submission **Checklist**. This is a mandatory file during submission. Upload the completed checklist and choose the file type as "Checklist".

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for

more details.

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:

Manuscript:

- Include keywords
 - All figures (include relevant captions)
 - All tables (including titles, description, footnotes)
 - Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / *Highlights files* (where applicable)
Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

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.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

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, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), 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 Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the

authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, 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. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will 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.

Copyright

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

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

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.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

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 Author Services.

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

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

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). 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 details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also 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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **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.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

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. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

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.

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 <http://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.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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. Further information on the preparation of electronic artwork.

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 and shading in table cells.

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 highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that

support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<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 plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

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 can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... 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. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

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.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. 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. 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.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to

link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. 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 will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. 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 Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.