



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DIEGO LUIS RIBEIRO

**“Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade, viabilidade celular e cinética do ciclo celular em células HepG2 submetidas aos extratos de *Bauhinia holophylla* (Bong.)Steud. e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld”**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

DIEGO LUIS RIBEIRO

**“Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade, viabilidade celular e cinética do ciclo celular em células HepG2 submetidas aos extratos de *Bauhinia holophylla* (Bong.)Steud. e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld”**

DIEGO LUIS RIBEIRO

**“Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade, viabilidade celular e cinética do ciclo celular em células HepG2 submetidas aos extratos de Bauhinia holophylla (Bong.)Steud. e Machaerium hirtum (Vell.) Stellfeld”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus.

Co-orientadora: Dra. Juliana Mara Serpeloni.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R484a Ribeiro, Diego Luis.

Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade, viabilidade celular e cinética do ciclo celular em células HepG2 submetidas aos extratos de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld / Diego Luis Ribeiro. – Londrina, 2014.  
114 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Coorientador: Juliana Mara Serpeloni.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Mutagênese – Teses. 2. Células cancerosas – Fígado – Teses. 3. Plantas medicinais – Teses. 4. Toxicologia genética – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Serpeloni, Juliana Mara. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 575.24:615.89

DIEGO LUIS RIBEIRO

**“Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade, viabilidade celular e cinética do ciclo celular em células HepG2 submetidas aos extratos de *Bauhinia holophylla* (Bong.)Steud. e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilce Mara de Syllos  
Cólus  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lusânia Maria Gregg Antunes  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Maria Bastos Paoliello  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de fevereiro de 2014.

*“À Deus, meus pais e a todas as pessoas que me deram apoio  
e acreditaram ao meu lado, dedico este trabalho”*

## **AGRADECIMENTOS**

Nesse momento especial da minha vida, gostaria de agradecer todas as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui, isso vale tanto para ajuda direta quanto para o apoio e motivação de formarem a pessoa que sou hoje.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois nada seríamos sem a ajuda de nosso pai bondoso, que nos momentos mais difíceis está sempre nos apoiando. Obrigado por tudo senhor!!

Meus pais, que sempre batalham e fazem o possível e impossível para que eu continue meus estudos e siga com o sonho de ser um geneticista. Devo tudo que sou a vocês que sempre serão minha fonte de inspiração e alegrias.

Obrigado a Tássia Juliane Malacarne, que sempre que possível estava do meu lado e me motivando com sua alegria e carinho. Obrigado também pelos seus ensinamentos e por aguentar minhas reclamações!!

Um obrigado especial à minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Ilce Mara de Syllos Cólus, que me acolheu em seu laboratório após um momento difícil e por ter me passado tanto conhecimento e experiência, e com orgulho posso dizer que fui e sou um dos filhos da Ilce! Obrigado também por tantos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Obrigado à minha co-orientadora, Dr.<sup>a</sup> Juliana Mara Serpeloni, por sua ajuda em toda a parte prática e teórica do meu trabalho, além de sua amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante os dois anos de mestrado. Ao Biota/FAPESP por ter financiado meu projeto.

Aos meus amigos e compadres Gustavo Barcelos e Talita Milan, que sempre estão ao meu lado e me acolhem com muito carinho e atenção em Ribeirão Preto.

Ao meu amigo e pós-doc do laboratório Marcelo Tempesta de Oliveira por passar sua experiência de PCR em tempo real e conversas fora do laboratório também.

Aos meus amigos em Toledo e Londrina. Saibam que me lembrei de todos!

A todos os integrantes, ex-integrantes e agregados do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos técnicos Melissa e Dário pelo suporte e ajuda prestada nesses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por todo o auxílio, em especial à secretária Sueli, que sempre esteve disposta a ajudar e à Prof.<sup>a</sup> Ana Lúcia Dias por todo o apoio e ajuda.

À Universidade Estadual de Londrina, que me acolheu muito bem e me forneceu toda a infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

*“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso,  
ao esforço, à dedicação, não existe meio termo.*

*Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.”*

*Ayrton Senna.*

RIBEIRO, Diego Luis. **Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade, viabilidade celular e cinética do ciclo celular em células HepG2 submetidas aos extratos de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld**". 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

O uso de fitoterápicos vem ganhando uma abordagem cada vez mais popular, com o intuito de prevenir, retardar ou tratar doenças crônicas. O Brasil, devido à sua grande biodiversidade, possui enorme potencial para uso de fitoterápicos com poder quimiopreventivo, porém, ainda há uma escassez de dados sobre ensaios e testes toxicológicos que comprovem o perigo e riscos dos mesmos. O projeto temático 'Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas – BIOTA/FAPESP' foi proposto com o objetivo de avaliar plantas do cerrado brasileiro que possam ser utilizadas como fitomedicamentos ou quimiopreventivos no tratamento de doenças por meio da avaliação de sua composição química e efeitos toxicológicos. Popularmente conhecida como "pata-de-vaca", *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. é uma planta distribuída amplamente no Brasil e usada na medicina popular para tratamento de diabetes. *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld é uma planta conhecida como "jacarandá-bico-de-pato", cuja casca é popularmente usada contra diarreia, tosse e câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, mutagênicos, antimutagênicos e alterações na viabilidade e cinética do ciclo celular de extratos etanólicos dessas duas plantas em células humanas metabolizadoras (HepG2). Para tais avaliações foram utilizados os testes do MTT (ensaio do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), azul de Tripán, ensaio do micronúcleo (incluindo o parâmetro Índice de Divisão Nuclear - IDN), ensaio de apoptose/necrose e citometria de fluxo. As citotoxicidades de diferentes concentrações desses extratos foram avaliadas por meio do ensaio do MTT em diferentes tempos de tratamento. Com base nos resultados obtidos, três concentrações de cada extrato foram escolhidas para avaliação de apoptose/necrose, mutagenicidade e cinética do ciclo celular. Posteriormente, uma concentração de cada extrato foi escolhida para avaliação do efeito protetor em protocolos associados com benzo[a]pireno (B[a]P). Nos resultados obtidos com *Machaerium hirtum*, somente altas concentrações do extrato foram citotóxicas para células HepG2. Induções de apoptose ou micronúcleos (MNs) não foram observadas, porém, a avaliação do IDN e citometria de fluxo indicaram diminuição da proliferação celular e bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Na avaliação do efeito protetor observou-se redução de células micronucleadas e apoptóticas, predominantemente em protocolos de pré e pós-tratamento, indicando possível ação quimiopreventiva. *Bauhinia holophylla* também apresentou nas maiores concentrações avaliadas. Não houve indução de células com MNs, todavia, houve redução da proliferação celular quando avaliado o IDN. Foram observadas reduções significativas de células apoptóticas e micronucleadas em todos os tratamentos associados. Entretanto, na cinética do ciclo celular todos os protocolos combinados aumentaram a população de células em fase S. O estudo fitoquímico de ambos os extratos indicou os flavonoides como constituintes majoritários, o que pode explicar a ausência de mutagenicidade e o significativo efeito protetor obtido em protocolos

associados. No entanto, a presença dos flavonoides também explica o efeito antiproliferativo e alterações observadas na cinética do ciclo celular, pois, segundo a literatura, alguns dos flavonoides encontrados nos extratos já apresentaram este efeito sobre células humanas. Em conclusão, este estudo demonstrou que os dois fitoterápicos avaliados podem ser indicados para serem utilizados como quimiopreventivos contra danos causados no DNA por agentes mutagênicos, prevenindo indiretamente inflamação e câncer. Porém, devem ser utilizados em baixas concentrações, pois em altas concentrações demonstraram potencial antiproliferativo em células humanas metabolizadoras HepG2.

**Palavras-chave:** *Bauhinia holophylla*. *Machaerium hirtum*. Citotoxicidade. Antimutagenicidade. Cinética do ciclo celular.

RIBEIRO, Diego Luis. **Assessment of mutagenicity, antimutagenicity, cell viability and cell cycle kinetics in HepG2 cells subjected to extracts of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. and *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld**". 2014. 111 p. Dissertation (Masters in Genetics and Molecular Biology) - State University of Londrina.

## ABSTRACT

The use of herbal medicines is gaining an increasingly popular approach, in order to prevent, delay the onset or treat chronic diseases. Brazil, due to its rich biodiversity, has enormous potential for use of herbal medicines with chemopreventive power, however, there is still a paucity of data on assays and toxicology tests demonstrating the danger and risk use thereof. The thematic project 'Phytotherapeutic standard for the treatment of chronic diseases - BIOTA/FAPESP' was proposed with the aim of evaluating the Brazilian cerrado plants that can be used as herbal medicines or chemopreventive in the treatment of disease through the evaluation of their chemical composition and toxicologic effects. Popularly known as "pata-de-vaca", *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. is widely distributed in Brazil and used in folk medicine to treat diabetes. *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld is known as "jacarandá-bico-de-pato", plant whose bark is popularly used against diarrhea, cough and cancer. The aim of this study was to evaluate the possible cytotoxic, mutagenic, antimutagenic effects and changes of the ethanol extracts of these two plants in the viability and cell cycle kinetics of human cells metabolizing (HepG2). It were used the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay), Trypan blue, Micronucleus test (including the parameter Nuclear Division Index - NDI), Apoptosis/Necrosis assay and Flow Cytometry. The cytotoxicity of different concentrations of these extracts were evaluated by the MTT assay at different times of treatment. Based on the results obtained, three concentrations of each extract were chosen for evaluation of apoptosis/necrosis, mutagenicity and cell cycle kinetics. Subsequently, one concentration of each extract was chosen for evaluating the protective effect with protocols associated with benzo[a]pyrene (B[a]P). Only high concentrations of *Machaerium hirtum* extract were cytotoxic to HepG2 cells. Induction of apoptosis or micronuclei (MN) was not observed, however, the evaluation of cell proliferation (NDI) and cell cycle kinetics (flow cytometry) indicated decreased cell proliferation and cell cycle blocked at G2/M phase. In the evaluation of the protective effect was observed reduction of micronucleated and apoptotic cells, predominantly in pre and post- treatment protocols, indicating a possible chemopreventive action. *Bauhinia holophylla* also presented, cytotoxicity was observed at the highest concentrations evaluated. There was no induction of cells with MNs in any concentration, however, there was a reduction of cell proliferation in NDI. Significant reductions of apoptotic and micronucleated cells were observed in all associated treatments. However in cell cycle kinetics, it was observed in all protocols a increased population of cells in S phase. The phytochemical study indicated that both extracts have flavonoids as major constituents, which may explain the lack of mutagenicity and significant protective effect obtained in associated protocols. Although the presence of flavonoids also explains the antiproliferative effect and the changes observed in cell cycle kinetics, according to the literature, some flavonoids present in the extracts have shown this effect on human cells. In conclusion, this

study demonstrated that both herbal medicine evaluated may be indicated for use as chemopreventive against DNA damage caused by mutagens, preventing indirectly inflammation and cancer. However, it should be used in low concentrations because at high concentrations it showed an antiproliferative potential in HepG2 human metabolizing cells.

**Key-words:** *Bauhinia holophylla.* *Machaerium hirtum.* Citotoxicity. Antimutagenicity. Cell cycle kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<b>Classes de fitoquímicos sintéticos e naturais que podem agir como agentes quimiopreventivos no tratamento do câncer .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b>	<b>Folhas e flores de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.)Steud .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b>	<b>Exemplar de <i>Machaerium hirtum</i> (Vell.) Stellfeld .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b>	<b>Fotomicrografia de células HepG2 analisadas por meio do teste do Micronúcleo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b>	<b>Fotomicrografia de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) coradas com laranja de acridina e brometo de etídio para avaliação da apoptose.....</b>	<b>28</b>
<b>ARTIGO 1</b>		
Figura 1.	Viabilidade celular (%) observada em células HepG2 nos tratamentos com diferentes concentrações do extrato de <i>Machaerium hirtum</i> no ensaio do MTT.....	42
Figura 2.	Frequência de células HepG2 (%) com diferentes concentrações do extrato de <i>Machaerium hirtum</i> no ensaio de apoptose/necrose em 24h de tratamento.....	44
Figura 3.	Frequência de células (%) observadas no ensaio de apoptose/necrose em células HepG2 para tratamentos associados com o extrato de <i>Machaerium hirtum</i> e B[a]P após 3h de tratamento e 24h de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata totalizando 600 células analisadas por tratamento .....	46
Figura 4a.	Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se Citometria de Fluxo em células HepG2 para tratamentos com o extrato de <i>Machaerium hirtum</i> .....	47
Figura 4b.	Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se Citometria de Fluxo em células HepG2	

em tratamentos associados entre extrato de <i>M. hirtum</i> e B[a]P .....	48
---	----

## ARTIGO 2

Figura 1.	Viabilidade celular (%) observada em células HepG2 sob tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> e em diferentes tempos no ensaio do MTT.....	69
Figura 2.	Frequência de células HepG2 (%) observadas após tratamento de 24 horas com diferentes concentrações do extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> no ensaio de apoptose/necrose .....	71
Figura 3.	Viabilidade celular (%) observada após o ensaio de exclusão por Azul de Trypan e ensaio de Apoptose/Necrose em células HepG2 para tratamentos associados com o extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> em tempo de tratamento de 3 horas e 24 horas .....	73
Figura 4a.	Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se análise por citometria de fluxo em células HepG2 para tratamentos com o extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> .....	74
Figura 4b.	Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se se análise por citometria de fluxo em células HepG2 para tratamentos associados com extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> e B[a]P .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Frequência de células HepG2 micronucleadas (MN) em 3000 células binucleadas, índice de divisão nuclear (IDN) em 1500 células analisadas e % de células micronucleadas (% de céls. MN) após tratamento de 24 horas com três concentrações diferentes do extrato de <i>Machaerium hirtum</i> e seus respectivos controles.....	43
<b>Tabela 2:</b>	Frequência de células HepG2 micronucleadas (MN) em 3000 células binucleadas e índice de divisão nuclear (IDN) em 1500 células analisadas, porcentagem de redução de danos (%R) e células micronucleadas (% de céls. MNs) observadas em células HepG2 submetidas por 24 horas a diferentes protocolos de tratamento (simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) com extrato de <i>Machaerium hirtum</i> associado com benzo(a)pireno (B[a]P) e seus respectivos controles.....	45
ARTIGO 2		
<b>Tabela 1.</b>	Flavonoides identificados no extrato etanólico das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> após utilização das metodologias de HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS .....	68
<b>Tabela 2.</b>	Frequência de células micronucleadas (MN) em 3000 células analisadas e índice de divisão nuclear (IDN) em 1500 células analisadas em células HepG2 submetidas ao tratamento com 3 concentrações do extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> e seus respectivos controles após 24h de tratamento .....	70
<b>Tabela 3.</b>	Frequência de células micronucleadas (MN) em 3000 células analisadas, índice de divisão nuclear (IDN) e porcentagem de redução de danos (%R) em 1500 células analisadas em células HepG2 submetidas a protocolos de tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento com extrato de <i>Bauhinia holophylla</i> associado com benzo(a)pireno (B[a]P) e seus respectivos controles positivo, negativo e solvente.....	72

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1.	Quimioprevenção.....	16
1.2.	Projeto Biota-FAPESP.....	18
1.3.	Extratos Vegetais.....	20
1.3.1.	<i>Bauhinia holophylla</i> .....	20
1.3.2.	<i>Machaerium hirtum</i> .....	22
1.4.	Ensaio para avaliação de citotoxicidade, apoptose, mutagenicidade e antimitagenicidade dos extratos padronizados.....	24
1.4.1.	Ensaio de viabilidade celular.....	24
1.4.1.1.	Ensaio do MTT.....	24
1.4.1.2.	Ensaio de exclusão com Azul de Trypan.....	24
1.4.2.	Ensaio de mutagenicidade – Teste micronúcleo.....	24
1.4.3.	Ensaio de Apoptose e Necrose.....	26
1.4.4.	Citometria de Fluxo.....	28
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1.	Objetivo geral.....	30
2.2.	Objetivos específicos.....	30
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO, APOPTÓTICO E PROTETOR DO EXTRATO DE <i>Machaerium hirtum</i> (Vell.) Stellfeld EM CÉLULAS HUMANAS HepG2</b> .....	32
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2: <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud.: UM FITOTERÁPICO COM POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO, ANTIAPOPTÓTICO E CITOPROTETOR</b> .....	58
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	86
<b>7</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	91
7.1	Normas da Revista <i>Toxicology in Vitro</i> .....	91
7.2	Normas da Revista <i>Journal of Ethnopharmacology</i> .....	100

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Quimioprevenção

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos tem aumentado consideravelmente, bem como os relatos e crenças de que essas possuem efeitos benéficos e são livres de efeitos adversos (SERPELONI; CÓLUS, 2008). Como consequência, a utilização de fitoterápicos (como compostos isolados ou extratos) tornou-se uma abordagem cada vez mais popular para prevenir, retardar ou tratar o aparecimento de doenças crônicas, como por exemplo, o câncer (MEHTA et al., 2010).

Por definição, a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, emitida pela ANVISA, define fitoterápico como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais. Já fitomedicamento é uma designação dada apenas aos medicamentos fitoterápicos que apresentarem estudos clínicos de eficácia e segurança (com posologia, indicação, efeitos colaterais e reações adversas bem definidas), realizados com o medicamento em questão (BRASIL, 2004).

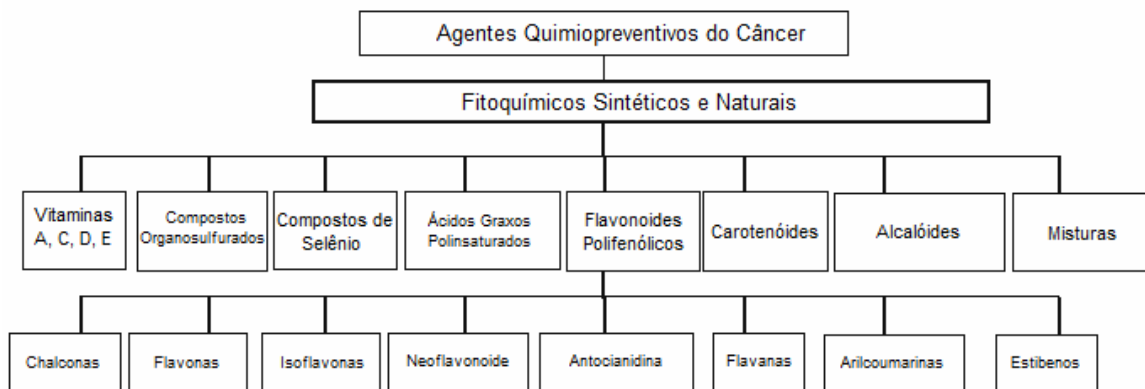
Segundo Mehta et al. (2010), a definição moderna de quimioprevenção vem desde a década de 70 e consiste basicamente em incluir o uso de agentes naturais ou farmacológicos para prevenir, suprimir, interromper ou reverter o processo de carcinogênese em suas fases iniciais.

Segundo Raffter (2002), os estudos sobre quimioprevenção mostraram que o consumo de frutas, legumes, grãos e chás estavam associados com a diminuição de muitos tipos de câncer e, posteriormente, estudos caso-controle mostraram que constituintes de frutas e vegetais possuem um conteúdo elevado de compostos bioativos que podem agir como agentes quimiopreventivos.

Para alcançar a prevenção do câncer, o foco está principalmente no uso de fitoquímicos da dieta que, em tese, são seguros para o consumo humano (SURH, 2003; LEE et al., 2011). O consumo destes fitoquímicos tem sido considerado uma estratégia eficaz para reduzir danos genotóxicos que podem levar a mutações

(SURH, 2003; FERGUSON et al., 2004) e os modelos biológicos têm sido fundamentais para demonstrar a eficácia desses compostos. No entanto, estudos com agentes quimiopreventivos presentes na dieta para prevenção do risco de câncer em seres humanos ainda não são totalmente conclusivos (MEHTA et al., 2010).

Um grande número de fitoquímicos, como por exemplo, os representados na Figura 1, possuem propriedades antioxidantes que são importantes na modulação de vias de sinalização celular associadas com a carcinogênese (ABRAHAM et al., 2012).



**Figura 1. Classes de fitoquímicos sintéticos e naturais que podem agir como agentes quimiopreventivos no tratamento do câncer.**

**Fonte: Mehta et al. (2010).**

Antioxidante na literatura atual é um termo amplamente utilizado, mas raramente definido. A definição clássica deste termo foi feita por Halliwell & Gutteridge (1999) que classificaram antioxidantes como sendo “qualquer substância que quando em baixa concentração comparada com as de outro substrato oxidável, seja capaz de evitar ou atrasar significativamente a oxidação desse substrato” (TIRZITIS; BARTOSZ, 2010).

A interação covalente de espécies reativas, principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas por um agente carcinogênico com o DNA pode resultar em um dano genotóxico. A prevenção precoce desses danos, por meio da atividade antioxidante, é considerada um dos principais mecanismos de inibição de mutagênese/carcinogênese (DE FLORA et al., 2001; ABRAHAM et al., 2012).

Devido à grande utilização de produtos vegetais pela população, a

Organização Mundial de Saúde (OMS) tem fortalecido a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário (GRIPPI, 2001). Com base nisso, uma série de resoluções foram publicadas pela OMS com o objetivo de expandir o uso de plantas medicinais terapêuticas para a medicina tradicional e para os serviços de saúde de vários países. No Brasil, o Ministério da Saúde também desenvolve diversas ações junto a órgãos governamentais e não-governamentais para elaboração de políticas públicas voltadas para o desenvolvimento do setor e para a inserção de plantas medicinais e da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006).

Um dos projetos que foram elaborados justamente para colaborar com esta política nacional de desenvolvimento de fitoterápicos/fitoquímicos e com a segurança do seu uso pela população é o projeto Biota-FAPESP.

## 1.2 Projeto Biota-FAPESP

Para que qualquer vegetal alcance a categoria de fitoterápico ou fitomedicamento deve-se cumprir uma série de exigências como: (a) autenticação botânica da espécie empregada; (b) parte da planta utilizada; (c) fatores ambientais e sazonalidade na coleta; (d) condição de coleta; (e) ausência de contaminação por outros materiais; (f) boas práticas de fabricação e condições laboratoriais; (g) conhecer componentes ativos e quantificar marcadores farmacológicos (CARVALHO, 2012).

Inúmeras espécies vegetais são altamente tóxicas, por isso, a legislação brasileira prevê que, para registro de um fitoterápico, a eficácia e segurança devem ser comprovadas, sendo necessário para isto, o estudo da composição química e das atividades farmacológicas e toxicológicas do mesmo (BRASIL, 2006).

O mercado brasileiro de fitoterápicos ainda se encontra restrito devido à falta de investimentos para que sejam cumpridas as exigências acima citadas. Visando padronizar este mercado de fitoterápicos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu uma legislação específica por meio da portaria RDC 48/04 de 16 de março de 2004, que se baseia na "garantia de qualidade (...) exigindo a reprodutibilidade dos fitoterápicos produzidos", o que só pode ser alcançado se

forem utilizados extratos padronizados e também se for estabelecido um rígido controle de qualidade (BRASIL, 2004).

Outro cenário em questão é o pouco uso das plantas medicinais no Brasil, considerando que sua biodiversidade com potencial medicinal é uma das maiores do planeta (BRASIL, 2009). Esta sub utilização está relacionada, principalmente, à ausência de dados científicos que comprovem as atividades farmacológicas propostas e à possível ausência de plantas medicinais que ofereçam perigo para a saúde humana.

Devido a estes fatores, em 1999 foi criado o programa BIOTA-FAPESP, com o objetivo de investigar e caracterizar a biodiversidade do estado de São Paulo, definindo os mecanismos para sua conservação, potencial econômico e sua utilização sustentável (<http://www.biota.org.br/info/index>). Uma das subareas mais importantes deste programa é a sua contribuição para o Programa de Pesquisas sobre Plantas Medicinais (PPPM) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), que visa desenvolver novos fitoterápicos que poderão compor a lista de medicamentos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Portanto, dentro do Programa Biota foi proposto um projeto temático de pesquisa para avaliar a biodiversidade da flora do cerrado do estado de São Paulo quanto ao potencial terapêutico para o tratamento de doenças e, posteriormente, recomendar ou não sua utilização no sistema de saúde nacional.

Diante da necessidade de se encontrar novos princípios ativos e extratos para tratamento de doenças crônicas que possam ser disponibilizados, este projeto 'Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas – BIOTA/FAPESP' (atualmente na segunda fase de estudos) visa justamente aumentar o interesse etnofarmacológico por plantas do cerrado brasileiro e do estado de São Paulo e avaliar se as mesmas possuem eficácia terapêutica para serem utilizadas como fitoterápicos padronizados.

A farmacopéia brasileira é baseada na Instrução Normativa nº 5 da ANVISA de 31 de março de 2010, que estabelece a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. Nesta resolução fica determinado que para todo fitoterápico deve-se conhecer os seus compostos bioativos, realizar ensaios pré-clínicos em modelos biológicos para avaliação de atividades

toxicológicas, indicações de posologia e responsabilidade profissional (BRASIL, 2010).

O estudo das atividades toxicológicas é de grande valia, pois deve-se considerar a possibilidade do fitoterápico em estudo e de seus constituintes apresentarem propriedades hepatotóxicas, nefrotóxicas, neurotóxicas e posteriormente atividades mais específicas, como atividades citotóxica, genotóxica e mutagênica, que podem levar ao desenvolvimento de neoplasias (EATON; GILBERT, 2012). Também existem evidências de que moléculas que apresentam simultaneamente atividades mutagênica e citotóxica podem apresentar atividade anticâncer (DI GIORGIO et al., 2011).

Outro ponto de interesse é a busca por fitoterápicos que apresentem ação antimutagênica, ou seja, com capacidade de reduzir as frequências de mutações espontâneas ou induzidas, podendo ser utilizados na quimioprevenção do câncer. A quimioprevenção é também importante para se evitar a recorrência de câncer e metástase após cirurgia e quimioterapia, e se evitar o desenvolvimento de resistência a drogas quimioterápicas (STONER, 2009). Assim, uma das metas do projeto BIOTA-FAPESP é a obtenção de dados sobre atividades biológicas de extratos padronizados, entre elas, a citotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores.

### 1.3 Extratos Vegetais

#### 1.3.1 *Bauhinia holophylla*

*Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. (Figura 2.) é uma leguminosa que, segundo Souza (2008), pertence ao Filo Magnoliophyta, Ordem Fabales, Família Fabaceae (Leguminosae). Plantas do gênero *Bauhinia* pertencem à tribo Cercideae e têm ampla distribuição geográfica, ocorrendo em países da América Latina e do Norte e nos continentes asiático e africano (LEWIS et al., 2005). Conhecida popularmente como miroró, pata-de-vaca e pata-de-anta, *Bauhinia holophylla* é um vegetal arbustivo, e de suas folhas secas à sombra é feito um chá. Esta espécie é uma planta nativa brasileira, com distribuição nas regiões Norte (Rondônia), Centro-

oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) (VAZ, 2013).



**Figura 2. Folhas e flores de *Bauhinia holophylla* (Bong.)Steud.**

**Fonte: Acervo da Universidade de Brasília, 2010.**

Os extratos do gênero *Bauhinia*, obtidos de parte de suas plantas como folhas, raízes ou sementes, têm sido utilizados através dos tempos com fins medicinais por populações para o tratamento de diabetes (BICALHO et al., 2005). Khan et al. (1976) relataram indícios seguros da presença de insulina em plantas do gênero *Bauhinia*. Oliveira et al. (1999) investigaram a presença de insulina nos vegetais da família das leguminosas, plantas bastante utilizadas no Brasil para o controle de diabetes (PANIZZA, 1997) e detectaram, além de insulina em vagens e tegumentos de sementes, a presença de insulina nas folhas de pata-de-vaca, como são conhecidas as plantas do gênero *Bauhinia* (BICALHO et al., 2005).

Segundo Martins (2009), *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. é um arbusto que pode atingir de 1,5 a 3 metros de altura; seu caule é suberoso, ramos levemente canaliculados, folhas bilobadas e flores pediceladas. Ainda segundo a mesma autora, plantas estudadas no noroeste paulista mostraram floração nos meses de janeiro a abril e frutificação de março a junho, sua aparência também foi associada a de floresta estacional semidecidual e cerradão, justificando a sua presença no projeto Biota-Fapesp.

Em janeiro de 2009 o Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, publicou a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse para o SUS (RENISUS). Nessa lista, constam as plantas

medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, incluindo algumas espécies do gênero *Bauhinia* (BRASIL, 2009). Portanto, um aumento no número de estudos sobre plantas deste gênero é importante para que, futuramente, esta lista seja ampliada.

### 1.3.2 *Machaerium hirtum*

As plantas atribuídas ao gênero *Machaerium* são leguminosas que, segundo Souza (2008), pertencem ao Filo Magnoliophyta, Ordem Fabales, Família Fabaceae (Leguminosae). O gênero *Machaerium* faz parte da tribo Dalbergieae e é considerado um dos maiores gêneros arbóreos tropicais de leguminosas. Atualmente são distribuídas do México à Argentina, com representantes ocorrendo também na costa oeste africana (RUDD, 1977; LEWIS et al., 2005). Espécies de *Machaerium* são amplamente utilizadas no manejo florestal, como plantas de sombra e recuperação de áreas degradadas. A seiva vermelha tem sido usada por tribos indígenas para o tratamento de picadas de cobras e folhas de algumas espécies são um substituto da cocaína (LEWIS et al., 2005).

*Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld (Figura 3.), conhecida popularmente como jacarandá-bico-de-pato, é um vegetal do tipo árvore, caracterizada pelos espinhos retilíneos e achatados, folíolos oblongos ou estreito-oblongos, brilhantes na face adaxial e hábito arbóreo. Floresce nos meses de fevereiro e março e frutifica de março a agosto (POLIDO & SARTORI, 2007). É uma planta nativa do Brasil e ocorre em quase todos os estados brasileiros (exceção de Amapá, Rondônia, Roraima e Rio Grande do Sul) (FILARDI, 2013). Os poucos relatos na literatura sobre o seu uso afirmam que o chá obtido da casca desta espécie é utilizado no tratamento de diversos tipos de doenças crônicas, porém, popularmente é utilizado no tratamento de câncer, diarreia e tosse (POTT; POTT, 2004).

Para identificação do possível perigo causado por compostos químicos, entre eles fitoterápicos, é necessária uma série de avaliações. Entre essas avaliações, estão os testes *in vitro* e de curta duração, que são realizados no projeto Biota-FAPESP por meio de ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em linhagens celulares (normais e tumorais), como é o caso desse estudo.

A utilização de ensaios de genética toxicológica na avaliação do perigo de fitoterápicos é de extrema importância, considerando-se que estes ensaios fornecem

dados que podem ser utilizados posteriormente nas avaliações dose-resposta, caracterização de risco e avaliação de exposição em seres humanos. Estudos com diferentes fitoterápicos conhecidos avaliaram o perigo dos mesmos utilizando ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, como por exemplo, *Ginkgo biloba* (De Feudis et al., 2003), Chá verde (*Camelia sinensis*) (Durgo et al., 2011) e Camomila (*Matricaria recutita*) (Hernandez-Ceruelos et al., 2010). Entretanto, plantas utilizadas no projeto Biota-FAPESP, como *Bauhinia holophylla* e *Machaerium hirtum* ainda não possuem dados na literatura sobre suas atividades citotóxicas, mutagênicas e antimutagênicas.



**Figura 3. Exemplar de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld.**

**Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/jacesp.htm>**

## 1.4 Ensaios para avaliação de citotoxicidade, apoptose, mutagenicidade e antimutagenicidade dos extratos padronizados.

### 1.4.1 Ensaios de viabilidade celular

#### 1.4.1.1 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi descrito inicialmente por Mosmann (1983) e consiste na redução do sal de tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) pela enzima da membrana interna mitocondrial, succinato desidrogenase, de células viáveis, formando os cristais de formazan (1-[4,5-dimetil-2-il]3,5-diphenylformazan). Portanto, estes cristais produzidos estão diretamente relacionados com a quantidade de células vivas metabolicamente ativas, uma vez que a atividade de redução do MTT é atribuída à atividade da cadeia respiratória mitocondrial celular, fornecendo uma viabilidade estimada (BERNHARD et al., 2003).

Segundo Mosmann (1983), este ensaio serve como alternativa para medir proliferação, atividade celular e citotoxicidade causadas por diferentes compostos. Assim, a utilização deste teste tornou-se importante para determinação de concentrações a serem testadas em ensaios posteriores.

#### 1.4.1.2 Ensaio de exclusão com Azul de Trypan

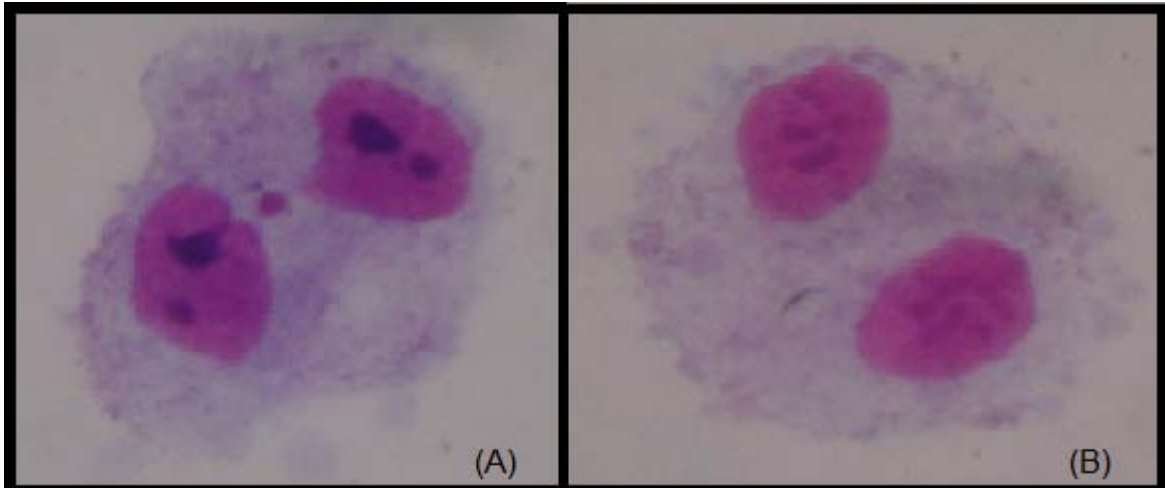
O teste de exclusão com Azul de Trypan é um ensaio de viabilidade celular adequado para avaliar danos causados à membrana plasmática (FRESHNEY, 2001), podendo indicar a citotoxicidade de compostos. O corante Azul de Trypan penetra apenas em células que possuem danos irreversíveis em sua membrana, ou seja, nas células não viáveis, enquanto que as células viáveis têm a membrana intacta e não permitem a entrada do corante (FORNELLI et al., 2004).

### 1.4.2 Ensaio de mutagenicidade – Teste do micronúcleo

Micronúcleos (MNs) podem ser encontrados em células em divisão como pequenos corpos extranucleares, resultantes de quebras cromossômicas e/ou cromossomos inteiros que não atingiram os polos da célula durante a divisão celular (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Em telófase, quando o envoltório nuclear é reconstituído em torno das duas células-filhas, esses fragmentos ou cromossomos atrasados não são incorporados no núcleo principal, mas encapsulados em separado em um núcleo menor, denominado micronúcleo (para revisão KIRSCH-VOLDERS et al., 2002, 2011; MATEUCA et al., 2006; FENECH et al., 2011).

Micronúcleos podem abrigar fragmentos cromossômicos que surgem por quebra direta do DNA de fita dupla (DSB) ou por conversão de quebra-fita simples (SSB) em DSB após a replicação celular. Podem ainda ter sua origem a partir de fragmentos derivados do rompimento, durante a telófase, de pontes anafásicas formadas devido aos rearranjos cromossômicos como cromossomos dicêntricos, cromossomos em anel ou união de cromátides irmãs (NORPPA; FALCK, 2003). Por fim, podem também resultar de um mecanismo de defesa, como a perda de fragmentos cromossômicos extras oriundos de amplificação gênica (cromossomos *double-minute*) quando o DNA amplificado é seletivamente localizado em sítios específicos na periferia do núcleo. Esse DNA é eliminado por meio de brotamento nuclear (NBUD) durante a fase S do ciclo celular, e após o término deste ciclo, pode resultar em micronúcleos (MATEUCA et al., 2006; FENECH et al., 2011).

Com a metodologia baseada na inibição da citocinese com citocalasina-B (CBMN), Fenech & Morley (1985) forneceram uma abordagem eficiente para distinguir células que não se dividem (células mononucleadas) de células que completaram a divisão nuclear durante a cultura *in vitro* (células binucleadas). Desde então, o teste de micronúcleo *in vitro* (Figura 4) tem se tornado uma ferramenta atraente para avaliar mutagenicidade devido à sua capacidade de detectar danos clastogênicos e aneugênicos e também por sua simplicidade de análise, precisão e ampla aplicabilidade em diferentes tipos celulares. Uma vez que os dois mecanismos básicos que levam à formação de micronúcleos são quebras cromossômicas e alteração da segregação cromossômica, a formação de micronúcleos exige uma divisão mitótica que é realizada neste protocolo descrito (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).



**Figura 4. Fotomicrografia de células HepG2 analisadas por meio do teste do Micronúcleo *in vitro*.**

**(A) Célula binucleada micronucleada, (B) Célula binucleada. Corante: Giemsa 5%; Aumento: 400x. Acervo do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina, 2013.**

#### 1.4.3 Ensaio de Apoptose e Necrose

A apoptose é uma forma distinta e importante de morte celular programada determinada geneticamente, que resulta na eliminação de células (ELMORE, 2007). Este processo ocorre durante o desenvolvimento normal e envelhecimento como um mecanismo fisiológico essencial para manutenção da homeostase em populações de células nos tecidos e, além disso, pode ocorrer como um mecanismo de defesa em reações imunológicas ou quando as células sofrem danos causados por agentes nocivos ou por doenças (NORBURI; HICKSON, 2001).

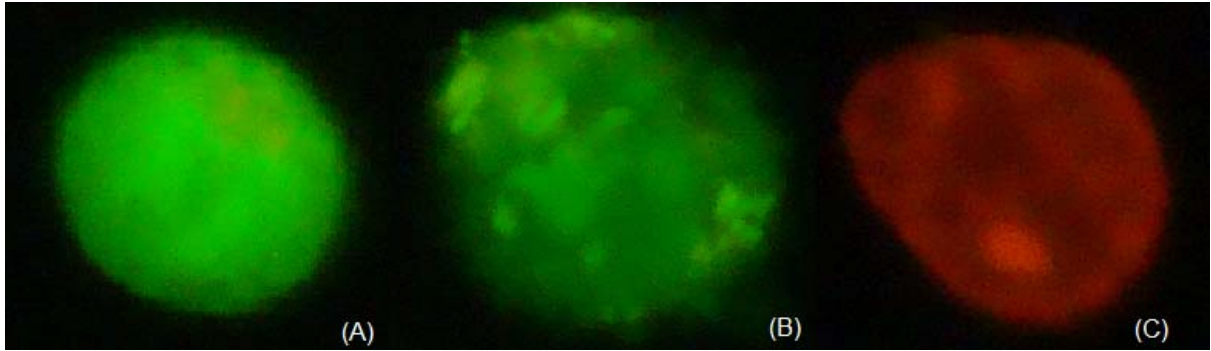
O processo apoptótico elimina células com danos irreversíveis no material genético ou com defeitos em sua replicação, pois estes podem levar ao estabelecimento de mutações, e o acúmulo destas pode resultar no surgimento de algumas doenças, como o câncer. Em células cancerosas, observa-se frequentemente a inibição de genes relacionados a este processo (BURHANS et al., 2003).

A morte celular por necrose está associada à perda precoce da integridade da membrana plasmática, levando a um colapso da homeostase interna, extravazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, a uma ativação da resposta inflamatória. Isto diferencia o processo de morte por necrose e apoptose, já

que nesta última observa-se a conservação da integridade da membrana plasmática, permitindo a eliminação da célula sem a ativação da resposta inflamatória (RAFFRAY; COHEN, 1997).

Outro fator de relevância biológica importante é a inflamação, que é um componente crítico da progressão do tumor e também é associado à necrose. Muitos cânceres surgem de locais de infecção, irritação e inflamação crônica, e agora é claro que o microambiente do tumor, que é largamente orquestrado por células inflamatórias, é um indispensável participante no processo neoplásico, promovendo a proliferação, sobrevivência e migração celular. Além disso, as células tumorais têm apresentado algumas das moléculas sinalizadoras do sistema imunológico, como selectinas, quimiocinas e seus receptores para a invasão, migração e metástase (COUSSENS; WERB, 2002). Todavia, é proposto que a indução de apoptose através da liberação do citocromo C da mitocôndria e subsequente ativação das caspases -9 e -3 e/ou interferência na progressão do ciclo celular, vem promovendo a redução da ativação e estimulação das vias cancerígenas que são associadas à vigilância imunológica (COUSSENS; WERB, 2002; BRIGATI et al., 2002).

A técnica descrita por McGahon et al. (1995) para distinguir os eventos de apoptose e necrose consiste na coloração diferencial das células com laranja de acridina (AO) e brometo de etídio (EB), o que permite diferenciar células normais, apoptóticas e necróticas, considerando-se a morfologia e a coloração das mesmas. As células com membrana intacta são coradas em verde (células normais e apoptóticas), e estas são diferenciadas entre si pela presença ou ausência dos corpos apoptóticos (similares a bolhas). Já as células necróticas não possuem a membrana intacta e são coradas em vermelho, devido à incorporação do brometo de etídeo (Figura 5).



**Figura 5. Fotomicrografia de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) coradas com laranja de acridina e brometo de etídio para avaliação da apoptose.**

Em (A) célula viável, em (B) célula apoptótica e em (C) célula necrótica. Aumento de 400x. Acervo do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina, 2013.

#### 1.4.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método amplamente utilizado para analisar rapidamente células individuais em uma população celular. Durante esta análise, células derivadas de uma amostra são hidrodinamicamente focadas em um fluxo fluido, de modo que passem e sejam interceptadas, uma após a outra, por um feixe de raio laser. A dispersão de luz resultante e os sinais fluorescentes gerados fornecem informações de diferentes características celulares, como tamanho, granulosidade intracelular e a existência de marcadores intra e extra-celulares (MEYER, 2013).

Por meio do desenvolvimento tecnológico nas últimas duas décadas, a capacidade e a versatilidade da citometria de fluxo aumentaram consideravelmente (CHATTOPADHYAY et al., 2008), principalmente devido aos novos instrumentos e reagentes e, conseqüentemente, o número de parâmetros avaliados por este ensaio também aumentou (CHATTOPADHYAY et al., 2006). Devido a isto, a técnica ganhou grande popularidade entre pesquisadores de diversas áreas, sendo utilizada, por exemplo, na avaliação de drogas, amostras ambientais, desenvolvimento de linhagens celulares e pesquisas com células-tronco (MEYER, 2013).

Estudos utilizando citometria de fluxo são frequentes na literatura utilizando diferentes parâmetros e formas de avaliação, principalmente para apoptose e ciclo celular. Exemplos de trabalhos na literatura é o estudo de Akan e Garip (2013), que

avaliaram o efeito quimioprotetor de quercetina (flavonóide natural) e observaram diminuição da apoptose induzida por peróxido de hidrogênio sobre células K562 (células derivadas de leucemia mielóide crônica). Outro exemplo é o trabalho de Yang et al. (2012), que observaram parada do ciclo celular e aumento de apoptose em células T24 (câncer de bexiga) após tratamento com arctigenina (um tipo de lignano vegetal).

Por fim, a possibilidade de análise de multi parâmetros, tais como variações do ciclo celular, proliferação celular, alterações do conteúdo de DNA e RNA nas células, mudanças nas membranas plasmáticas, contagem de células, identificação de populações celulares (como leucócitos e linfócitos), avaliação de estado redox em estresse oxidativo, identificação de pigmentos celulares (por exemplo, clorofila), identificação e quantificação de antígenos, quantificação de moléculas (carboidratos, triglicerídeos, aldeídos e colesterol) e análises mais específicas dentro da área de mutagênese, como análise de apoptose e contagem de células micronucleadas, torna este ensaio uma ferramenta útil para obtenção e compreensão de respostas biológicas (NURSE; HAYLES, 2011).

Considerando a escassez de estudos disponíveis sobre avaliação de perigo de dois extratos padronizados de plantas do cerrado brasileiro (*Bauhinia holophylla* e *Machaerium hirtum*), e o seu uso pela população para o tratamento de doenças crônicas, esse estudo pretende contribuir para determinar quais extratos poderão ser utilizados como fitoterápicos pela medicina moderna sem causar efeitos adversos à saúde humana. Para isso serão avaliados efeitos citotóxicos, alterações de ciclo celular e possíveis ações mutagênicas e antimutagênicas de extratos etanólicos das duas espécies de plantas, utilizando linhagem celular metabolizadora (células HepG2). Os resultados obtidos permitirão sugerir novos e promissores agentes que possam ser utilizados pela população na quimioprevenção de doenças crônicas ou como quimioterápicos em terapia anticâncer nos sistemas de saúde.

Também é de interesse deste estudo contribuir e fornecer informações para o projeto temático “Fitoterápicos padronizados para o uso de doenças crônicas” no qual este estudo está inserido.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar a toxicidade genética de plantas do cerrado brasileiro por meio de ensaios *in vitro*, para que possam ser utilizadas com segurança e eficácia terapêutica no tratamento ou quimioprevenção de doenças crônicas.

### 2.2 Objetivos específicos

Realizar ensaios com extratos padronizados obtidos de *Machaerium hirtum* e *Bauhinia holophylla* em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) para avaliar:

- ✓ os possíveis efeitos citotóxicos dos extratos sobre as células utilizando os testes de viabilidade celular por exclusão com Azul de Trypan e MTT;
- ✓ os possíveis efeitos mutagênicos e antimutagênicos em protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento por meio do teste do micronúcleo *in vitro*;
- ✓ os efeitos dos extratos na indução/redução do processo de apoptose e/ou necrose em diferentes protocolos de tratamento por meio da coloração diferencial com laranja de acridina/ brometo de etídeo;
- ✓ os possíveis efeitos dos extratos na proliferação celular (IDN) e cinética do ciclo celular (citometria de fluxo)

**3 ARTIGO 1**

Artigo a ser submetido à revista "Toxicology in Vitro".

ISSN: 0887-2333 (Online)

FI: 2.716

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO, APOPTÓTICO E PROTETOR DO EXTRATO DE *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld EM CÉLULAS HUMANAS HepG2**

DIEGO LUIS RIBEIRO<sup>1</sup>; HELOÍSA LIZOTTI CILIÃO<sup>1</sup>; ANA FLÁVIA LEAL SPECIAN<sup>1</sup>; JULIANA MARA SERPELONI<sup>2</sup>; MARCELO MARUCCI PEREIRA TANGERINA<sup>3</sup>; WAGNER VILEGAS<sup>3</sup>; ELIANA APARECIDA VARANDA<sup>2</sup>; WILNER MARTÍNEZ-LÓPEZ<sup>4</sup>; ILCE MARA SYLLOS CÓLUS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Unidade São Vicente, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Vicente, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Instituto de Investigações Biológicas Clemente Estable, Montevideú, Uruguai.

**Endereço para correspondência:** Ilce Mara de Syllos Cólus, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil.

**E-mail:** colus@sercomtel.com.br

## RESUMO

*Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld (*M. hirtum*) é uma planta conhecida como “jacarandá-bico-de-pato” cuja casca é popularmente usada contra diarreia, tosse e câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do extrato de *M. hirtum* na viabilidade celular e instabilidade genômica, bem como seus efeitos protetores em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). As menores concentrações que não diminuíram a viabilidade celular foram escolhidas para os demais ensaios. Benzo[a]pireno (B[a]P) foi utilizado como controle positivo. Células micronucleadas (MNs) ou apoptóticas não foram observadas em nenhuma das concentrações testadas, no entanto, o Índice de Divisão Nuclear (IDN) e dados de citometria de fluxo indicaram uma diminuição da proliferação celular. O efeito protetor dos extratos foi avaliado em protocolos associados com B[a]P nas condições de simultâneo, pré e pós-tratamento, e foi observada redução significativa de células apoptóticas e MNs, predominantemente em pré e pós-tratamento, indicando possível prevenção de danos causados pelo B[a]P. A presença dos antioxidantes apigenina e luteolina, identificados neste extrato, podem explicar os efeitos protetores, pois estes componentes podem inibir a formação de espécies reativas de oxigênio e impedir o processo apoptótico e a indução de danos no DNA. Em conclusão, o extrato de *M. hirtum*, em baixas concentrações mostrou potencial ação quimiopreventiva e ausência de perigo, podendo ser utilizado para proteção de danos no DNA causados por agentes mutagênicos.

**Palavras-chave:** micronúcleo, apoptose, efeito protetor, *Machaerium hirtum*, flavonoides.

## INTRODUÇÃO

O consumo de plantas medicinais e sua utilização na saúde têm evoluído desde as formas mais simples de tratamento até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (Lorenzi e Matos, 2002). Nos últimos tempos, muitos estudos têm sido dirigidos para a identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas (Santos et al., 2012; Zhang et al., 2013). Tais produtos naturais podem ser utilizados diretamente ou para a extração de novos princípios bioativos (Domingo e López-Brea, 2003).

A definição de planta medicinal consiste em “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos” (OMS, 1998). Diante do aumento da utilização de produtos vegetais por parte da população para fins culturais, medicinais ou sociais, tem aumentado a valorização da utilização de plantas medicinais para a expansão dos serviços de saúde. Todavia, a detecção e avaliação dos efeitos biológicos causados por compostos vegetais são de essencial importância para a minimização dos seus possíveis riscos à saúde humana (Cardoso et al., 2006).

Juntamente com o aumento do uso terapêutico, estudos sobre mutagenicidade e anti-mutagenicidade de plantas têm aumentado com o objetivo de comprovar a eficácia das mesmas nas mais diversas finalidades farmacológicas (Jiménez et al., 2005) e no auxílio como agentes quimiopreventivos.

Uma das principais famílias utilizadas como planta medicinal é a família Leguminosae, também conhecida como Fabaceae, que compreende aproximadamente 727 gêneros e 19.327 espécies ocorrendo em toda faixa tropical e em regiões temperadas (Lewis et al., 2005). O gênero *Machaerium*, pertencente à família Fabaceae, encontra-se entre as maiores espécies arbóreas tropicais de leguminosas, possuindo cerca de 130 espécies distribuídas do México à Argentina, com um representante ocorrendo na costa oeste africana (Rudd, 1977).

Várias espécies do gênero *Machaerium* são de uso farmacológico, como é o caso de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld., que é uma planta cuja casca é utilizada na medicina popular contra diarreias, tosse e no tratamento de câncer (Pott e Pott, 2004), sendo conhecida popularmente como “jacarandá-bico-de-pato”. Segundo o estudo de Ignoato et al. (2012), *M. hirtum* possui em sua composição química compostos como flavanonas, alcalóides,

triterpenos e esteróides, indicando sua possível ação anti-inflamatória; porém, dados sobre sua ação citotóxica, mutagênica e antimutagênica ainda são inexistentes.

Numa tentativa de melhorar terapias anticâncer, agentes têm sido intensamente investigados, sejam eles de origem natural ou sintética (Smith et al., 2005). Estes agentes quimiopreventivos podem inibir danos primários no DNA, seja através do sequestro de espécies reativas, alteração de enzimas metabolizadoras de drogas, bloqueio da ligação ao DNA ou alteração nas taxas de reparo do DNA (Uhl et al., 2003; De Flora e Ferguson, 2005; Nafisi et al., 2008; Bokulić et al., 2011).

O uso de linhagens celulares humanas para avaliação de perigo e risco de compostos químicos sintéticos ou naturais e para detecção de propriedades antimutagênicas tem se tornado também cada vez mais comum, principalmente aquelas linhagens que possuem enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos. Uma dessas linhagens celulares, a HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), possui diferentes enzimas metabolizadoras de drogas de fase I e II, sendo apropriada para determinação de possíveis perigos toxicológicos e detecção de efeitos antimutagênicos mediados por modulação de enzimas de ativação/detoxificação (Kassie et al., 2003).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais citotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato de *M. hirtum* em células humanas cultivadas *in vitro* (HepG2), com a finalidade de verificar possíveis atividades biológicas que possibilitem a utilização segura e eficaz desta planta medicinal pela população humana, e como possível quimiopreventivo contra danos causados ao DNA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e Estudo Fitoquímico

Folhas de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld foram coletadas em dezembro de 2012 por Almeida, L.F.R. na Rodovia João Hipólito Martins, km 3, em Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Um espécime de *M. hirtum* foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Campus de Botucatu-SP, Brasil, sob nº BOTU 027643.

As folhas (1,0 Kg) foram secas ao ar e trituradas em um moinho. Os extratos foram extraídos com etanol (EtOH) 70% e a suspensão foi protegida da luz e percolado a 20 gotas/minuto, resultando em um extrato hidroalcoólico. O extrato etanólico foi evaporado em vácuo para se obter um resíduo escuro (170 g, 17 %) e posteriormente foi dissolvido em uma

mistura de metanol/água (1:1, v/v), sendo depois sucessivamente particionado com n-hexano. A fração aquosa (3,0 g) foi fracionada por cromatografia em coluna de permeação em gel. A coluna foi empacotada com Sephadex (LH-20, 57cm X 3,0 cm de “internal diameter”) e embebida com uma proporção de metanol: água (8:2, v/v). A coluna foi então eluída com a mesma mistura de solventes e se obteve 390 frações (coletadas por número de gotas que saem da coluna após injetar na coluna). Após a análise de TLC (cromatografia de camada fina), as frações foram separadas e analisadas e as frações semelhantes foram combinadas para produzir 12 subfrações. Uma das subfrações foi solubilizada em 1,0 ml da mistura metanol/água (1:1, v/v) e foi centrifugada a 2500 rpm/min durante 20 minutos. Este procedimento forneceu uma solução de cor amarela escura com precipitado de cor amarela clara e após eliminação do solvente desta solução escura (400 mg) o material foi purificado por HPLC-RI preparativa.

A análise química preliminar das principais classes de metabólitos secundários de folhas de *M. hirtum* foi realizada de acordo com métodos propostos por Matos (1997). As análises de TLC foram realizadas em gel de sílica (200 µm; Sorbent Technologies®), e visualizada utilizando-se luz UV (254 e 365 nm). Os espectros de ESI-MS, utilizado para identificação dos componentes majoritários, foram obtidos com um espectrômetro (Thermo Scientific®) no modo negativo (70 V). As amostras foram dissolvidas em MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) e injetadas diretamente. A análise de HPLC foi obtida em um equipamento HPLC Jasco® modelo PU-2089 equipado com sistema detector de arranjo de fotodiodos Jasco® com uma coluna Phenomenex® Luna(2) RP 18 (250x4,6 mm, 5 µm).

## **Tratamentos**

Após as etapas químicas realizadas no Laboratório de Biodiversidade e Sustentabilidade da UNESP de São Vicente-SP, uma fração do extrato hidroalcoólico seco de *M. hirtum* foi enviada para o Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, diluída em tampão fosfato salino (PBS), obtendo-se uma solução na concentração de 62500 µg/mL. Essa solução inicial foi filtrada, mantida em tubos estéreis e armazenada a -20°C com ausência de luz e protegida de qualquer contato com outros reagentes para manutenção de sua estabilidade química. A partir desta solução, diluições foram feitas para realização dos ensaios biológicos.

## **Reagentes Químicos**

B[a]P (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>; CAS: 50-32-8, Sigma-Aldrich - St. Louis – MO - USA) foi utilizado como controle positivo nos experimentos e foi diluído em dimetilsulfoxido (DMSO, CAS: 67-68-5, JT Baker - Center Valley – PA - USA), na concentração de 504 µg/mL (20µM), seguindo o Guideline 487 da OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico), onde a concentração final de DMSO não excedeu 1% em meio de cultura.

Citocalasina B (CAS: 14930-96-2, C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>; Sigma-Aldrich St. Louis – MO - USA) foi diluída em DMSO para se obter uma solução-estoque concentrada de 2mg/mL que foi mantida a 4°C em ausência de luz. Para a preparação da solução de uso, a solução estoque foi diluída em PBS (0,3 mg/mL) obtendo-se uma concentração final de 3 µg/mL de Citocalasina B em cultura durante a realização dos experimentos, tais condições foram definidas previamente por nosso grupo de pesquisa.

Laranja de Acridina (CAS: 65-61-2, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>) e Brometo de Etídio (CAS: 1239-45-8, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis – MO - USA) e foram utilizados para a análise de células apoptóticas e necróticas. O sal de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) defenitetrazolium bromide, CAS: 298-93-1, C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S) foi obtido de Invitrogen (Eugene – OR - USA).

### **Linhagem Celular e Condições de Cultura**

As células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL pelo Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP, USP - Brasil. As células HepG2 foram cultivadas em 10 mL de meio DMEM (Gibco, Grand Island - NY - USA) suplementado com 15% de soro bovino fetal - SBF (CAS: 12657-029, Gibco, Grand Island - NY - USA), 1% de solução antibiótico-antimicótico (CAS: 15240-062, Gibco, Grand Island - NY - USA) e 0,024% de bicarbonato de sódio (CAS: 144-55-8, Sigma-Aldrich, St-Louis – MO - USA), a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram conduzidos entre a terceira e a oitava passagem celular, sendo que as células HepG2 sob essas condições, possuem ciclo celular de aproximadamente 24 horas.

### **Ensaio de Citotoxicidade – MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).**

O ensaio do MTT foi utilizado para determinação da citotoxicidade do extrato de *M. hirtum* em células HepG2, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983) com

modificações. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>3</sup>, tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e 1x10<sup>4</sup> células foram colocadas por poço em placas de 96 poços em um volume de 200 µL de meio de cultura completo. Após estabilização de 24 horas o meio foi retirado e 11 diferentes concentrações do extrato (0,6; 1,2; 2,4; 4,8; 9,7; 19,5; 39,0; 78,1; 156,2, 312,5 e 625 µg/mL) foram aplicadas em meio de cultivo mínimo (ausência de SBF) para avaliação da citotoxicidade em células HepG2 (7 poços para cada concentração) nos tempos de 3, 24, 48, 72 e 96 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Após os tratamentos, 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço e incubados por 4 horas. Por fim, o meio contendo a solução de MTT foi retirado e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro (Uniscience, São Paulo, SP - Brasil) a 550nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Os valores do controle negativo foram considerados como 100% para normalização dos dados obtidos.

### **Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)**

O ensaio do micronúcleo (MN) foi realizado de acordo com o método descrito por Fenech (2007) com modificações (Citocalasina-B a 3 µg/mL; Citrato de Sódio 1% a 4°C como solução hipotônica; Formaldeído 25%; Giemsa 5%) e todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Primeiramente, 0,5 x 10<sup>6</sup> células HepG2 foram colocadas em cada frasco de cultura contendo 5 mL de meio completo e estabilizadas por 24 horas. Após a estabilização, as células foram tratadas da seguinte maneira: (i) três concentrações do extrato de *M. hirtum* (0,6, 2,4 e 9,7µg/mL) por 24 horas para avaliação de mutagenicidade (ii) uma concentração do extrato (2,4 µg/mL) para ensaios de antimutagenicidade em protocolos associados de pré-tratamento (tratamento com extrato por 24h e depois B[a]P por 24h), tratamento simultâneo (tratamento com extrato e B[a]P simultaneamente por 24h) e pós-tratamento (tratamento com B[a]P por 24h e depois com extrato por 24h). Depois dos tratamentos, as células foram incubadas por 30 horas com Citocalasina B (3 µg/mL) para obtenção de células binucleadas. Em todos os experimentos foram realizados controles negativo (PBS) e positivo (B[a]P), sendo que para os ensaios de antimutagenicidade cada experimento teve seu respectivo controle. Na etapa de fixação, as

células HepG2 foram lavadas duas vezes com 5mL de PBS, tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 174 g/min. Logo após, o *pellet* foi ressuspenso em solução hipotônica (citrato de sódio, CAS: 6132-04-3, Sigma-Aldrich, St.Louis – MO - USA, 1% a 4°C) e 30 µL de formaldeído a 25% por 4 minutos. As células foram centrifugadas novamente e fixadas duas vezes em solução de 3mL:1mL de metanol:ácido acético. As células fixadas foram transferidas para lâminas previamente lavadas e mantidas em água destilada gelada para formação de um filme. As lâminas foram coradas com Giemsa (CAS: 1.09204.0500, Merck®, Rio de Janeiro – RJ - Brasil) a 5% diluído em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 M, pH 6.8, Merck®, Rio de Janeiro – RJ - Brasil) por 8 minutos e mantidas a 4°C até o momento da análise microscópica em microscópio de luz Nikon. Para determinar a frequência de células com MNs foram analisadas 3000 células binucleadas com citoplasma preservado (1000 células por replicata). O critério de identificação de células binucleadas e MNs seguiu o descrito por Kirsch-Volders et al. (2000). A porcentagem de redução de danos (%R) no DNA foi obtida a partir da fórmula proposta por Waters et al. (1990) descrita abaixo:

$$\%R = \frac{[\%MN \text{ B[a]P}] - [\%MN \text{ Tratamento}]}{[\%MN \text{ B[a]P}] - [\%MN \text{ CN}]} \times 100$$

### Índice de Divisão Nuclear – IDN

O Índice de Divisão Nuclear (IDN) foi determinado de acordo com o protocolo de Fenech (2007). Para cada experimento 500 células foram analisadas, e somente células com citoplasma preservado e que possuíam de 1 a 4 núcleos foram consideradas. Para o cálculo do IDN a seguinte fórmula de Eastmond e Tucker (1989) foi aplicada:

$$IDN = \frac{M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)}{N}$$

onde M1, M2, M3 e M4 correspondem ao número de células com um, dois, três e quatro núcleos respectivamente, e N é o número total de células viáveis analisadas.

### Ensaio de Indução de Apoptose

A indução de apoptose pelo extrato de *M. hirtum* em células HepG2, bem como a possível proteção do extrato contra este evento, foram avaliados usando a técnica descrita por McGahon et al. (1995). Esta técnica baseia-se em uma coloração diferencial das células com os corantes fluorescentes laranja de acridina (LA) e brometo de etídeo (BE), que possuem a capacidade de distinguir células normais, células em apoptose inicial e final e células

necróticas. No total,  $0,1 \times 10^6$  células foram colocadas em placas de 24 poços e foram tratadas seguindo-se os mesmos protocolos usados para os ensaios do MN. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e com controles negativo (PBS) e positivo (B[a]P). Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas e 25µL da suspensão celular foram misturada com 10µL da solução de coloração (100 µg/mL de LA e 100 µg/mL de BE). O homogeneizado foi então colocado sobre lâminas limpas, coberto com lamínulas e 600 células por tratamento (200 por replicata) foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon, com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm. Para validação desses experimentos, o ensaio de exclusão por Azul de Trypan, que mede a viabilidade celular foi utilizado. A porcentagem de redução (%R) de células apoptóticas também seguiu o descrito por Waters et al. (1990).

$$\%R = \frac{[\% \text{ apoptose B[a]P}] - [\% \text{ apoptose Tratamento}]}{[\% \text{ apoptose B[a]P}] - [\% \text{ apoptose CN}]} \times 100$$

### **Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo foi realizada de acordo com o protocolo de Ormerod (2000). No total,  $0,1 \times 10^6$  células foram colocadas em placas de 24 poços e foram tratadas seguindo-se os mesmos protocolos usados para os ensaios do MN. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com controles negativo (PBS) e positivo (B[a]P). Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, fixadas em 2 mL de solução etanol 70% e permaneceram no gelo por 30 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas a 174 g/min por 5 minutos e resuspendidas em 400µL de PBS. Em seguida, foram adicionados 50µL de solução de RNase (1 mg/mL em água) e 50µL de solução de iodeto de propídeo (400µg/mL em água) e incubado a 37°C por 30 minutos. As amostras foram então submetidas ao separador de células com fluorescência ativada (FACS, FACSVantage, Becton Dickinson – Franklin Lakes - NJ - USA) e os dados foram analisados utilizando-se o software Cell Quest (Becton Dickinson - Franklin Lakes – NJ, USA) e perfis do ciclo celular foram desenhados utilizando-se o software FlowJo (Tree Star Incorporation, Ashland – OR – USA).

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos nos ensaios do MTT, CBMN (incluindo IDN) e Apoptose foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os dados obtidos

por citometria de fluxo foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunn. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 5 (La Jolla – CA – USA). Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Dados Fitoquímicos

O estudo químico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Machaerium hirtum* resultaram, até o momento, no isolamento de flavonóides. As análises cromatográficas por HPLC e espectrometria de massa (FIA – ESI – IT) evidenciam claramente a predominância de flavonas c-glicosiladas neste extrato vegetal. Através da quantificação realizada observou-se que saponarina (apigenina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosil-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) é o constituinte majoritário do extrato. Outros compostos como isovitexina (apigenina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo), isoorientina (luteolina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) e swertisina (7-metoxi-apigenina-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) também foram identificados (Tangerina et al., 2012 – trabalho em preparação).

### Ensaio do MTT

A Figura 1 mostra os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade. As três maiores concentrações testadas (156,2; 312,5 e 625  $\mu\text{g/mL}$ ) foram citotóxicas para as células HepG2 em todos os tempos de tratamento (3, 24, 48, 72 e 96h). Também foi possível observar que em todos os tempos de tratamento, as concentrações de 0,6, 2,4 e 9,7  $\mu\text{g/mL}$  mostraram viabilidades celulares similares ao controle negativo sendo, portanto, escolhidas para os ensaios de avaliação de apoptose, mutagenicidade, antimutagenicidade e cinética celular.

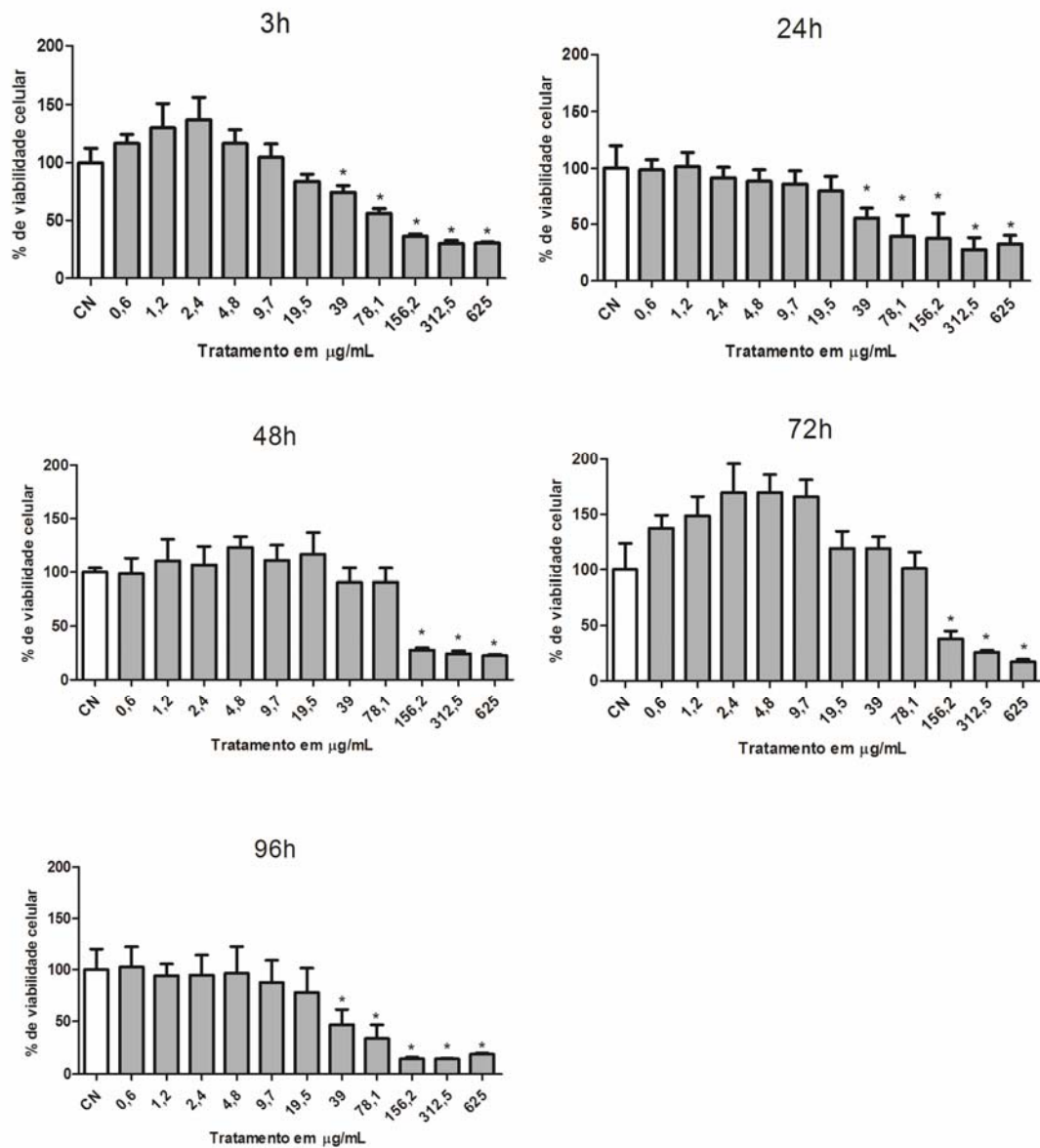


Figura 1. Viabilidade celular (%) observada em células HepG2 nos tratamentos com diferentes concentrações do extrato de *Machaerium hirtum* no ensaio do MTT. Os resultados são expressos como uma porcentagem em relação ao controle negativo (CN: PBS: Tampão Fosfato Salino).

\*Valores estatisticamente diferentes do CN ( $p \leq 0,05$ ).

## Avaliação da Mutagenicidade

Os resultados obtidos após o teste do MN/IDN são mostrados na Tabela 1. Somente o controle positivo (B[a]P) induziu aumento significativo na frequência de MNs, indicando que o extrato nas concentrações avaliadas, não possui atividade mutagênica. Em contrapartida, todas as concentrações testadas induziram uma diminuição estatisticamente significativa dos IDNs em relação ao grupo controle negativo (CN).

No ensaio de viabilidade por exclusão com Azul de Trypan, nenhuma diferença foi observada na viabilidade celular entre os grupos, que se manteve sempre acima de 90%. No ensaio de indução de apoptose/necrose somente o B[a]P induziu apoptose significativamente diferente do grupo controle negativo (Figura 2).

A concentração de 2,400 µg/mL do extrato de *M. hirtum* foi escolhida para os ensaios de antimutagenicidade, devido ao fato de ter apresentado no teste de mutagenicidade a menor frequência de células micronucleadas e não ter induzido apoptose/necrose.

**Tabela 1.** Frequência de células HepG2 micronucleadas (MN) em 3000 células binucleadas, índice de divisão nuclear (IDN) em 1500 células analisadas e % de células micronucleadas (% de céls. MN) após tratamento de 24 horas com três concentrações diferentes do extrato de *Machaerium hirtum* e seus respectivos controles.

Tratamentos (µg/mL)	Células micronucleadas			X±DP	% de céls. MNs	IDN			
	Repetições					Repetições			
	I	II	III			I	II	III	X±DP
CN	16	14	10	13,33±3,06	1.30	1,834	1,828	1,784	1,815±0,027*
CP	31	24	32	29,00±4,36*	2.90	1,702	1,614	1,646	1,654±0,045
Extrato									
0,6	17	15	15	15,67±1,16	1.57	1,684	1,700	1,678	1,687±0,011
2,4	13	12	11	12,00±1,00	1.20	1,652	1,692	1,722	1,689±0,035
9,7	16	13	15	14,67±1,53	1.47	1,604	1,616	1,566	1,595±0,026

\*Valores estatisticamente diferentes dos demais na mesma coluna ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey. (X ±SD = Média±Desvio Padrão) CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino), CP = Controle Positivo (B[a]P 20µM).

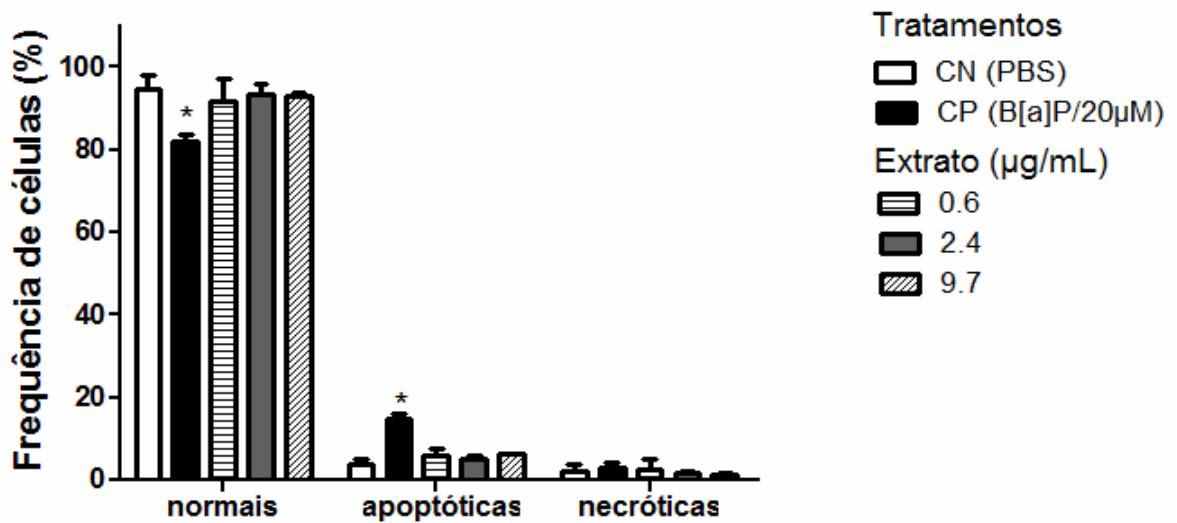


Figura 2. Frequência de células HepG2 (%) com diferentes concentrações do extrato de *Machaerium hirtum* no ensaio de apoptose/necrose em 24h de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata totalizando 600 células analisadas por tratamento.

\*Valores estatisticamente diferentes dos demais ( $p \leq 0,05$ ). CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino), CP = Controle Positivo (B[a]P 20µM).

### Efeito Protetor (Ensaio de Antimutagenicidade)

A avaliação do efeito protetor *in vitro* do extrato de *Machaerium hirtum* foi realizada seguindo três protocolos associados (pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento) e usando os testes do CBMN, IDN e Apoptose/Necrose. A Tabela 2 mostra dados obtidos para MNs e IDNs.

Em todos os protocolos de tratamento utilizados no teste CBMN, foi observado efeito protetor do extrato de *M.hirtum* sobre os MNs induzidos pelo B[a]P em células HepG2. Quanto ao IDN, os protocolos associados mostraram que o extrato reverteu o efeito antiproliferativo que o B[a]P exerceu sobre as células HepG2 em pós-tratamento (Tabela 2).

**Tabela 2:** Frequência de células HepG2 micronucleadas (MN) em 3000 células binucleadas e índice de divisão nuclear (IDN) em 1500 células analisadas, porcentagem de redução de danos (%R) e células micronucleadas (% de céls. MNs) observadas em células HepG2 submetidas por 24 horas a diferentes protocolos de tratamento (simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) com extrato de *Machaerium hirtum* associado com benzo(a)pireno (B[a]P) e seus respectivos controles.

Tratamentos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Células Micronucleadas			% de céls. MNs	%R	IDN			X $\pm$ DP	
	Repetições					Repetições				
	I	II	III	X $\pm$ DP		I	II	III		
<b>SIMULTÂNEO</b>										
CN	16	10	11	12,33 $\pm$ 3,21 <sup>a</sup>	1.23		1,518	1,524	1,522	1,521 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>
CP	26	27	30	27,67 $\pm$ 2,08 <sup>b</sup>	2.77		1,366	1,378	1,414	1,386 $\pm$ 0,025 <sup>a</sup>
SIM	20	16	15	17,00 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	1.70	69	1,726	1,626	1,456	1,603 $\pm$ 0,136 <sup>b</sup>
<b>PRÉ- TRATAMENTO</b>										
CN	11	12	10	11,00 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	1.10		1,592	1,490	1,518	1,533 $\pm$ 0,053
CP	23	23	26	24,00 $\pm$ 1,73 <sup>b</sup>	2.40		1,438	1,460	1,400	1,433 $\pm$ 0,030
PRÉ	13	17	14	14,67 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	1.47	72	1,338	1,498	1,502	1,446 $\pm$ 0,094
<b>PÓS- TRATAMENTO</b>										
CN	11	12	10	11,00 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	1.10		1,592	1,490	1,518	1,533 $\pm$ 0,053 <sup>a</sup>
CP	26	29	25	26,67 $\pm$ 2,08 <sup>b</sup>	2.67		1,416	1,438	1,390	1,415 $\pm$ 0,024 <sup>b</sup>
PÓS	15	15	16	15,33 $\pm$ 0,58 <sup>c</sup>	1.53	72,3	1,434	1,484	1,446	1,455 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>

Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente dos demais na mesma coluna ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

X  $\pm$  DP= Média  $\pm$  Desvio Padrão; CN: Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP: Controle Positivo (B[a]P 20  $\mu\text{M}$ ); SIM: Tratamento Simultâneo; PRÉ: Pré-Tratamento; PÓS: Pós-Tratamento.

A Figura 3 mostra os dados obtidos no teste de apoptose/necrose. Neste ensaio o extrato de *M. hirtum* mostrou efeito protetor sobre a morte celular induzida pelo B[a]P. A %R de células apoptóticas após 3h de tratamento foi 78% para tratamento simultâneo, 63% para pré-tratamento e 78% para pós-tratamento. Após 24 h o efeito protetor foi de 120% para pré e pós-tratamento. Em tratamento simultâneo o resultado obtido foi estatisticamente igual ao controle positivo. Portanto, os melhores resultados foram observados em pré e pós-tratamento no tempo de tratamento de 24 h (Figura 3). Nenhuma diferença em relação ao número de células necróticas foi observada entre os diferentes tratamentos. A frequência de células

apoptóticas aumentou significativamente após o tratamento de 3 e 24 horas com B[a]P em relação aos demais protocolos, e após 24 horas também houve aumento significativo de células apoptóticas em tratamento simultâneo.

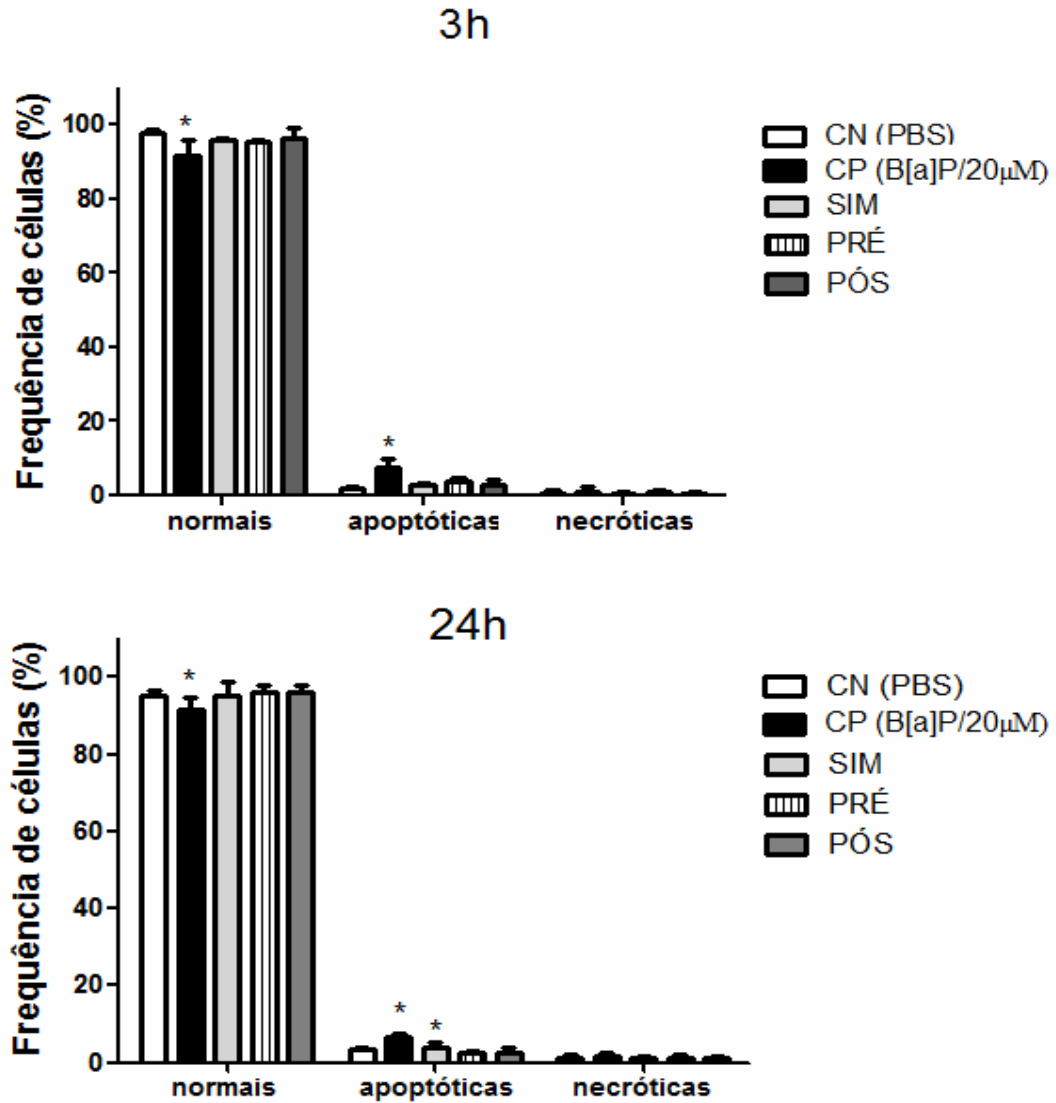


Figura 3. Frequência de células (%) observadas no ensaio de apoptose/necrose em células HepG2 para tratamentos associados com o extrato de *Machaerium hirtum* e B[a]P após 3h de tratamento e 24h de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata totalizando 600 células analisadas por tratamento.

\*Valores estatisticamente semelhantes entre si e diferentes dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

CN: Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP: Controle Positivo (B[a]P 20µM); SIM: Tratamento Simultâneo; PRÉ: Pré-Tratamento; PÓS: Pós-Tratamento.

### Análise de Ciclo Celular

Os resultados da análise da cinética do ciclo celular realizada por citometria de fluxo utilizando-se coloração diferencial com iodeto de propídeo estão demonstrados nas Figuras 4(a) e 4(b). Na Figura 4(a) observa-se que o extrato de *M. hirtum* nas três concentrações avaliadas diminuiu significativamente a população de células da fase G1; na concentração de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  houve um aumento significativo na população de células da fase S e nas concentrações de 0,6 e 2,4  $\mu\text{g/mL}$  observou-se um aumento da população de células em G2/M quando comparado ao CN, demonstrando, assim, um bloqueio de ciclo celular, promovido principalmente pela menor concentração analisada (0,6  $\mu\text{g/mL}$ ). B[a]P causou também alterações no ciclo celular quando comparado ao CN. A avaliação do efeito protetor [Figura 4(b)] indica que em pré-tratamento ocorreu uma recuperação dos efeitos causados pelo B[a]P em todas as fases do ciclo celular. Nos demais tratamentos, as diferenças observadas não foram relevantes.

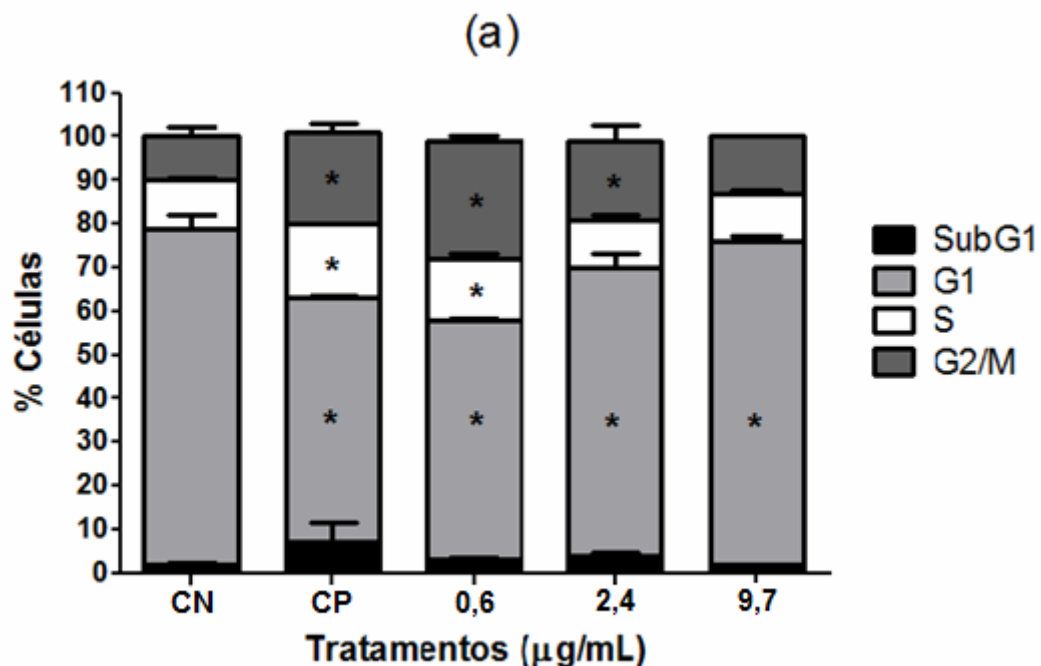


Figura 4a. Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se Citometria de Fluxo em células HepG2 para tratamentos com o extrato de *Machaerium hirtum*.

\*Valores estatisticamente diferentes do CN em sua respectiva fase ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Dunnet.

CN: Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP: Controle Positivo (B[a]P 20 $\mu\text{M}$ ).

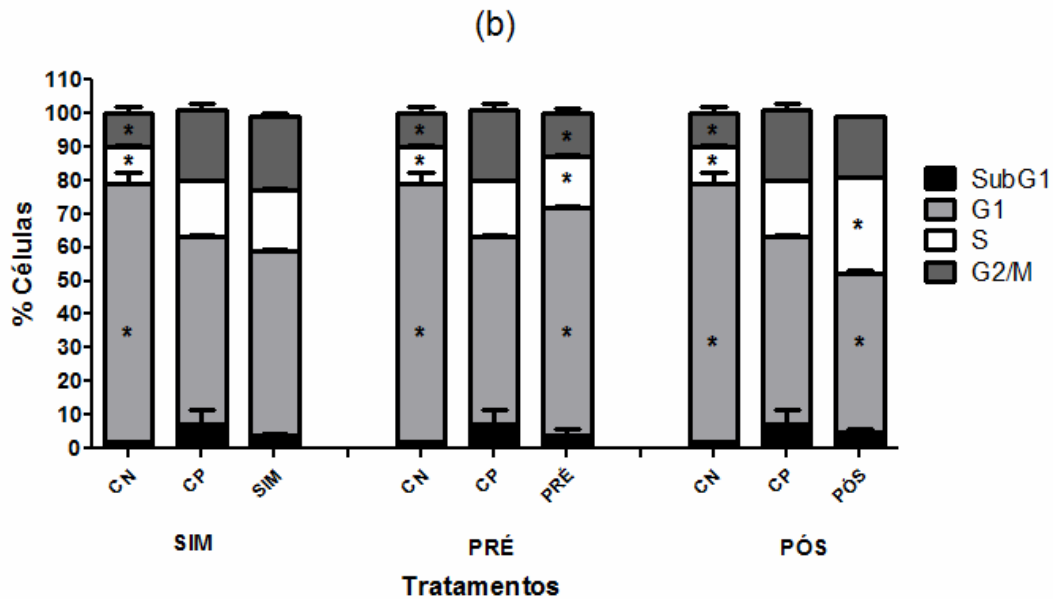


Figura 4b. Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se Citometria de Fluxo em células HepG2 em tratamentos associados entre extrato de *M. hirtum* e B[a]P.

\*Valores estatisticamente diferentes do CP em sua respectiva fase ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Dunnet. CN: Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP: Controle Positivo (B[a]P 20 $\mu$ M); SIM: Tratamento Simultâneo; PRÉ: Pré-Tratamento; PÓS: Pós-Tratamento.

## DISCUSSÃO

Segundo Knasmüller et al. (2002), nas últimas décadas vêm sendo demonstrados efeitos antimutagênicos de centenas de compostos derivados de plantas. Muitos compostos, além de possuírem propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, podem apresentar efeitos benéficos adicionais, como a ativação do sistema imunológico e atividade anti-inflamatória (Ignoato et al., 2012).

Sabe-se também, que é de grande importância desenvolver recomendações dietéticas relativas para o consumo seguro de plantas que contêm diferentes compostos em sua constituição, principalmente para extratos vegetais que possuem poucos dados na literatura sobre o seu uso.

Os dados do presente estudo mostram que altas concentrações do extrato de *M. hirtum* diminuíram drasticamente a viabilidade de células HepG2, o que pode induzir danos irreversíveis nessas células. As menores concentrações não diminuíram a viabilidade celular em relação ao grupo controle, portanto, este extrato não é citotóxico para células HepG2 em baixas concentrações, nas condições experimentais utilizadas.

Estudos fitoquímicos realizados demonstraram que o extrato das folhas de *M. hirtum* é rico, principalmente, em flavonóides c-glicosilados. Os compostos flavonoides podem

aparecer como suplementos da dieta, tanto nas formas não-glicosiladas como glicosiladas. Segundo Tangerina et al. (artigo em preparação), no extrato de *M. hirtum* os flavonoides c-glicosilados majoritários foram os da família apigenina: saponarina (apigenina-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-7-O-D- glucopiranosídeo), seguido por isovitexina (apigenina-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo) e da família luteolina, representado pela isoorientina (luteolina-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo). De acordo com Manach et al. (2005), esses flavonoides glicosilados, dependendo de sua estrutura, podem diferir quanto à sua biodisponibilidade em seres humanos, podendo esta ser maior ou menor do que as agliconas.

Os ensaios de mutagenicidade mostraram que nenhuma concentração do extrato de *M. hirtum*, após sua possível metabolização, aumentou a frequência de micronúcleos em células HepG2. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Boldrin et al. (artigo em preparação), que mostrou ausência de atividade mutagênica de diferentes concentrações do extrato em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* no teste de AMES, tanto na ausência como na presença de fração metabolizadora (S9).

O flavonoide majoritário do extrato de *M. hirtum*, a apigenina, foi avaliado e também não se mostrou mutagênico em linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* no teste de AMES e no teste de micronúcleo em camundongos CD1 (Bokulić et al., 2011). Este flavonoide tem sido identificado como um promissor agente quimiopreventivo devido às suas atividades antioxidante e antimutagênica contra agentes físicos e químicos, incluindo o B[a]P. Estas atividades foram descritas usando uma variedade de técnicas *in vivo* e *in vitro* como o teste de Ames (Birt et al., 1986; Choi et al., 1994; Nagasugi et al., 2000; Bokulić et al., 2011), teste do micronúcleo (Rithidech et al., 2005; Bokulić et al., 2011;) ensaio cometa (Jeyabal et al., 2005) e parâmetros enzimáticos (Khan et al., 2006).

No presente estudo, em tratamentos associados com o B[a]P foi verificado que o extrato de *M. hirtum* diminuiu a frequência de danos causados às células. O B[a]P exerce seu efeito citotóxico por meio da geração de espécies reativas, além de formar aductos de DNA por ligação covalente (Shiizaki et al., 2013). Um grupo diversificado de reativos de vida curta, como o radical hidroxila, o super óxido e o peróxido de hidrogênio, quando produzidos em excesso, resultam em estresse oxidativo e podem danificar proteínas, lipídios e o DNA, levando ao processo de morte celular por apoptose (Gupta et al., 2012; Johnson e Mejia, 2013).

Compostos que ocorrem naturalmente em plantas, como por exemplo, os flavonoides, podem interferir como agonistas ou antagonistas nas vias iniciadas de metabolização do B[a]P e podem, assim, modular o resultado final das alterações causadas por este composto

(Niestroy et al., 2011). Outra forma de ação destas substâncias é através da ativação de vias antioxidantes, como é o caso da via Nrf2, um fator de transcrição que age na região promotora de genes envolvidos na detoxificação de substâncias xenobióticas. Nrf2 é capaz de estimular a expressão de genes como Glutathionas-S-Transferases (*GSTA1* e *GSTP1*), o gene *NADPH* Quinona Oxidoreductase (*NQO1*) e o gene Subunidade Catalítica Glutamato-cisteína (*GCLC*) (Osburn & Kensler, 2008; Niestroy et al., 2011).

Diante do exposto acima, as reduções das frequências de MNs em torno de 72% em pré e pós-tratamento e de células apoptóticas induzidas pelo B[a]P em células HepG2 pelo extrato de *M. hirtum* podem ser atribuídas às atividades dos flavonoides presentes no extrato, ou seja, inibição das enzimas do metabolismo de B[a]P (pré-tratamento) e/ou ativação do processo de detoxificação celular (pós-tratamento).

Esta hipótese do presente estudo é confirmada pelos achados de Khan et al. (2006), que avaliaram a apigenina em células de fígado de camundongos Swiss albinos em tratamentos associados com B[a]P, demonstrando que a mesma suprimiu o metabolismo deste composto por meio da inibição de enzimas de fase I, inibindo concomitantemente, as quebras no DNA. O tratamento com apigenina também aumentou a indução de algumas enzimas de fase II, que são de extrema importância na detoxificação de xenobióticos, diminuindo assim, a disponibilidade de metabólitos reativos carcinogênicos capazes de interagir com o DNA. Os resultados já descritos na literatura para a apigenina e o fato dela ser um dos componentes majoritários do extrato de *M. hirtum*, a credenciam como o componente diretamente responsável pelos efeitos protetores observados no presente estudo.

Estudos anteriores com luteolina, outro flavonoide presente no extrato de *M. hirtum* indicam que a mesma é benéfica na prevenção da progressão de tumores (Hwang et al., 2011), reduz as respostas inflamatórias por meio da modulação da sinalização intracelular (Jang et al., 2008) e possui ação pró-apoptótica em células tumorais (Xavier et al., 2009). Apesar do extrato de *M. hirtum* avaliado no presente estudo ser rico em luteolina, este não induziu apoptose nas concentrações avaliadas e foi capaz de reverter o processo de apoptose induzido nas células HepG2 pelo B[a]P, principalmente após 24h de tratamento, em que a %R de células em apoptose foi de 120% em pré e pós-tratamento. Os resultados contraditórios obtidos no presente estudo em relação aos dados apresentados por Hwang et al. (2011) provavelmente se devem ao fato dos autores terem utilizado o componente isolado, enquanto no presente estudo, a luteolina era um dos componentes do extrato e, portanto, presente em uma quantidade menor.

Analisando-se o ciclo celular por citometria de fluxo, foi possível notar que o extrato de *M. hirtum* bloqueou o ciclo celular das células HepG2 em G2/M. Esse efeito provavelmente esteja também associado à presença de flavonoides na constituição do extrato, pois a luteolina é citada na literatura como responsável pela inibição do ciclo celular de células HepG2 em fase G2/M (Androutsopoulos & Spandidos, 2013). Ainda segundo os mesmos autores, este bloqueio pode ser explicado devido à luteolina possuir a ação de inibição da enzima DNA-topoisomerase I (Topo-I), fazendo com que a replicação não se complete e o ciclo seja interrompido em G2/M. Além disso, este mesmo fenômeno de interrupção do ciclo celular em fase G2/M também foi observado por Zhang et al. (2009) em outros tipos celulares com flavonoides que são estruturalmente relacionados, tais como apigenina, quercetina, kaempferol e miricetina.

Em conclusão, nossos estudos demonstram que o extrato etanólico de *M. hirtum*, planta utilizada popularmente para o tratamento de doenças crônicas como tosse, diarreia e câncer, em baixas concentrações e após sua possível metabolização, pode trazer benefícios à população humana e proteger o DNA de células normais contra danos causados por agentes pré-carcinógenos presentes no ambiente, como por exemplo, o B[a]P. Já sua ação como anticâncer para a população humana não é recomendada, pois este extrato protegeu contra danos causados no DNA e não induziu apoptose na célula utilizada neste trabalho, que é uma linhagem tumoral.

A ação deste extrato como quimiopreventivo provavelmente está associada à sua riqueza em flavonoides como apigenina e luteolina, que possuem ação antioxidante. Porém, ao se analisar sua ação sobre a cinética do ciclo celular, foi demonstrado que este extrato pode levar à inibição da proliferação e crescimento de células humanas, recomendando-se, assim, cuidado na dose escolhida para tratamento e mais investigações sobre suas possíveis ações adversas.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PROAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida ao aluno Ribeiro, D.L e produtividade para Cólus, I.M.S. Os autores também agradecem à Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano pelo uso do espectrofotômetro, e ao Serviço de Citometria de Fluxo e Classificação Celular do Instituto

de Investigações Biológicas Clemente Estable pela utilização do citômetro de fluxo FACSVantage.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Androutsopoulos, V.P., Spandidos, D.A., 2013. The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation. *J. Nutrit. Biochemis.* 24, 496-504.

Birt, D.F., Walker, B., Tibbels, M. G., Bresnick, E., 1986. Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinog.* 7, 959–963.

Bokulić, A., Garaj-Vrhovac, V., Brajša, K., Đurić, K., Glojnarić, I., Šitum, K., 2011. The effect of apigenin on cyclophosphamide and doxorubicin genotoxicity in vitro and in vivo. *J. Environ. Sci. and Health, Part A: Toxic/Hazardous Subst. Environ. Engin.* 46, 526-533.

Cardozo, T.A., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., D'Avila de Oliveira, N.C., Pereira, T.S., Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F., 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutat. Res.* 603, 83–96.

Choi, J.S., Park, K.Y., Moon, S.H., Rhee, S.H., Young, H.S., 1994. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella assay system. *Arch. Pharm. Res.* 17, 71–75.

De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 11, 8-15.

Domingo, D., López-Brea, M., 2003. Plantas com acción antimicrobiana. *Rev. españ. Quimiot.* 16, 385-393.

Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 34–43.

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Prot.* 2, 1084–1104.

Gupta, S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., Aggarwal, B.B., 2012. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1295–1322.

Hwang, Jin-T., Park, O.J., Lee, Y.K., Sung, M.J., Hur, H.J., Kim, M.S., Ha, J.H., Kwon, D.Y., 2011. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *Intern. J. Mol. Med.* 28, 25-31.

Ignoato, M.C., Fabrão, R.M., Schuquel, I.T.A., Botelho, M.F.P., Bannwart, G., Pomini, A.M., Arruda, L.L.M., Bersani-Amado, C.A., Santin, S.M.O., 2012. Chemicals constituents of *Machaerium hirtum* Vell. (Fabaceae) leaves and branches and its anti-inflammatory activity evaluation. *Nat. Prod. Res.* 1-6.

Jang, S., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2008. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 105, 7534-7539.

Jeyabal, P.V.S., Syed, M.B., Venkataraman, M., Sambandham, J.K., Sakthisekaran, D., 2005. Apigenin inhibits oxidative stress-induced macromolecular damage in N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. *Mol. Carcinog.* 44, 11-20.

Jiménez, M. R., Sanchés, J.C., Mohamed Analla, M., Andres, A.M.M., Moraga, A.A., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res./Genetic Toxicol. Environ. Mutag.* 585, 147- 155.

Johnson, J. L., Mejia, E. G., 2013. Interactions between dietary flavonoids apigenin or luteolin and chemotherapeutic drugs to potentiate anti-proliferative effect on human pancreatic cancer cells, in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 60, 83-91.

Kassie, F., Laky, B., Gminski, R., Mersch-Sundermann, V., Scharf, G., Lhoste, E., Knasmüller, S., 2003. Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay. *Chemico-Biolog. Interac.* 142, 285-296.

Khan, T.H., Jahangir, T., Prasad, L., Sarwat, S., 2006. Inhibitory effect of apigenin on benzo(a)pyrene-mediated genotoxicity in Swiss albino mice. *J. Pharmacy Pharmacol.* 58, 1655-1660.

- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Lorge, E., Norppa, H., Surrales, J., Von der Hude, W., Wataka, A., 2000. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 167–172.
- Knasmüller, S., Steinkellner, H., Majer, B.J., Nobis, E.C., Scharf, G., Kassie, F., 2002. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1052-1062.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A., Lock, J.M., 2005. *Legumes of the world*, 577p, Kew: Royal Botanic Gardens.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas, in: *Plantas Mediciniais*, LORENZI, H., MATOS, F.J.A. (Eds.), São Paulo: Nova Odessa, 544p.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Amer. J. Clin. Nutr.* 81, 230S–242S.
- Matos, F. J., 1997. *Introduction to experimental phytochemical*. 2.ed. EUFC, Fortress.
- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboudi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Green, D.R., 1995. The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*, in: Schurartz, L.M., Osbourne B. A. (Eds.), *Methods in cell biology*. San Diego, CA: Academic Press. 46, pp. 153–184.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Meth.* 65, 55–63.
- Nafisi, S., Hashemi, M., Rajabi, M., Tajmir-Riahi, H.A., 2008. DNA adducts with antioxidant flavonoids: morin, apigenin, and naringin. *DNA Cell Biol.* 27, 433–442.
- Niestroy, J., Barbara, A., Berbst, K., Rode, S., Liempt, M.V., Roos, P.H., 2011. Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the carcinoma cell line Caco-2. *Toxicol. In Vitro.* 25, 671-683.
- Nagasugi, T., Nakashima, M., Komai, K., 2000. Antimutagens in gaiyou (*Artemisia argyi* levl. et vant.). *J. Agricult. Food Chem.* 48, 3256–3266.

OECD, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit), OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 487, OECD, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>, 2010.

Organização Mundial da Saude. OMS. Bulletin of the World Health Organization (1998). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, 1-43.

Ormerod, M.G., 2000. Analysis of DNA – general methods, in Flow Cytometry. A Practical Approach, 3rd edit. (Ormerod, M. G., ed.), IRL press at Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 83-97.

Osburn, W.O., Kensler, T.W., 2008. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659, 31–39.

Pott, A., Pott, V. J. 2004. *Plantas do pantanal*, 320 p., Brasília: Embrapa.

Rithidech, K.N., Tungjai, M., Whorton, E.B., 2005. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 585, 96–104.

Rudd, V. E., 1977. The genus *Machaerium* (Leguminosae) in Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de Mexico.* 37, 119-146.

Santos, F.J.B.D., Moura, D.J., Péres, V.F., Sperotto, A.R.M., Camarão, E.B., Cavalcante, A.A.C.M., Saffi, J., 2012. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *J. Ethnopharm.* 144, 474–482.

Shiizaki, K., Kawanishi, M., Yagi, T., 2013. Dioxin suppresses benzo[a]pyrene-induced mutations and DNA adduct formation through cytochrome P450 1A1 induction and (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inactivation in human hepatoma cells. *Mutat. Res.* 750, 77– 85.

Smith, J.J., Tully, P., Padberg, R.M., 2005. Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy. *Semin. Oncol. Nurs.* 21, 243–251.

Uhl, M., Ecker, S., Kassie, F., Lhoste, E., Chakraborty, A., Mohn, G., Knasmuller, S., 2003. Effect of chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and benzo(a)pyrene (B[a]P) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. *Arch. Toxicol.* 77, 477–484.

Xavier, C.P., Lima, C.F., Preto, A., Seruca, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2009. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 281, 162-170.

Zhang, T., Jiang, S., He, C., Kimura, Y., Yamashita, Y., Ashida, H., 2013. Black soybean seed coat polyphenols prevent B(a)P-induced DNA damage through modulating drug-metabolizing enzymes in HepG2 cells and ICR mice. *Mutat. Res.* 752, 34-41.

Zhang, Q., Zhao, X.H., Wang, Z.I., 2009. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol. In Vitro.* 23, 797–807.

Waters, M. D., Brady, A.L., Stack, H. F., Brockman, H. E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res./Rev.Gen. Toxicol.* 238, 57-85.

**4. ARTIGO 2**

Artigo a ser submetido para a revista "Journal of Ethnopharmacology"

ISSN: 0378-8741

FI: 2.755

***Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.: UM FITOTERÁPICO COM POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO, ANTIAPOPTÓTICO E CITOPROTETOR**

DIEGO LUIS RIBEIRO<sup>1</sup>; HELOÍSA LIZOTTI CILIÃO<sup>1</sup>; ANA FLÁVIA LEAL SPECIAN<sup>1</sup>;  
JULIANA MARA SERPELONI<sup>2</sup>; WILNER MARTÍNEZ-LÓPEZ<sup>5</sup>; WAGNER VILEGAS<sup>3</sup>;  
ELIANA APARECIDA VARANDA<sup>2</sup>; LUIZ LEONARDO SALDANHA<sup>4</sup>; ANNE LÍGIA  
DOKKEDAL BOSQUEIRO<sup>4</sup>; ILCE MARA SYLLOS CÓLUS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Unidade São Vicente, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Vicente, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista – Bauru, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Instituto de Investigações Biológicas Clemente Estable, Montevideu, Uruguai.

**Endereço para correspondência:** Ilce Mara de Syllos Cólus, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil.

**E-mail:** colus@sercomtel.com.br

## RESUMO

**Relevância Etnofarmacológica:** Conhecida popularmente como “pata-de-vaca”, *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. (Fabaceae, Leguminosae) é uma planta usada na medicina popular brasileira para tratamento de diabetes e inflamação. No entanto, ainda há escassez de dados sobre suas atividades biológicas e dos seus compostos químicos em células de mamíferos. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, apoptóticos, mutagênicos, antimutagênicos e alterações no ciclo de células HepG2 após tratamento com o extrato de *Bauhinia holophylla*. **Material e Métodos:** A citotoxicidade de dez concentrações do extrato etanólico de *B. holophylla* foi avaliada pelo ensaio do MTT em tempos de 3, 24, 48 e 72 horas. Com base nos resultados obtidos, três concentrações foram escolhidas para avaliação de apoptose, mutagenicidade e cinética do ciclo celular. Posteriormente, uma concentração foi escolhida para avaliação do efeito protetor em protocolos associados com B[a]P, utilizando o teste do micronúcleo e citometria de fluxo.

**Resultados:** O estudo fitoquímico indicou a presença de flavonoides como componentes majoritários do extrato de *B. holophylla*. A citotoxicidade do extrato foi verificada somente nas maiores concentrações avaliadas pelo ensaio. Não houve indução de micronúcleos em qualquer das concentrações selecionadas. No entanto, foi observada redução da proliferação celular e a concentração de 30 µg/mL promoveu apoptose em tratamento de 24 horas. Foi observada uma redução significativa de células apoptóticas e micronucleadas em todos os tratamentos associados. Isso pode ser atribuída à presença de flavonóides identificados no extrato (miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e isorhamnetina), já descritos como antioxidantes, inibidores da formação de aductos no DNA e ativadores de enzimas detoxificantes. Ao se analisar a cinética do ciclo celular, foi observado em todos os protocolos combinados um aumento da população de células em fase S, o que é atribuído também à presença de alguns flavonoides, que possuem efeitos antiproliferativos em células humanas, principalmente em altas concentrações. **Conclusão:** O extrato de *B. holophylla* (Bong.) Steud. contém diferentes flavonóides, que provavelmente estão relacionados com os efeitos protetores observados na associação do extrato com o B[a]P, nas células HepG2. A ausência de efeitos citotóxicos e mutagênicos observados nos tratamentos somente com o extrato, bem como os efeitos protetores observados após associação do extrato com o B[a]P, indicam ausência de perigo quanto à sua utilização pela população humana. Todavia, deve ser usado em baixas concentrações, pois possui efeito antiproliferativo em concentrações acima de 7,5 µg/mL.

**Palavras-chave:** *Bauhinia holophylla*, micronúcleo, citometria de fluxo, flavonoides, fitoterápico.

## 1. INTRODUÇÃO

Fitoterápicos são substâncias de origem natural que se tornaram universalmente populares na atenção básica a saúde, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (Santos et al., 2012). Medicamentos e chás de plantas medicinais são popularmente presumidos como seguros para o consumo humano, sem qualquer efeito adverso sobre a saúde e, conseqüentemente, são utilizados na automedicação sem qualquer prescrição médica (Obici et al., 2008). No entanto, relatos na literatura demonstram que substâncias presentes em preparações medicinais podem apresentar efeitos tóxicos, incluindo danos no DNA (Verschaeve et al., 2004; Sisenando et al., 2009). Portanto, a detecção e avaliação de danos citotóxicos causados por compostos vegetais são de fundamental importância para minimização dos efeitos adversos de extratos de plantas, especialmente quando eles são usados em tratamentos a longo prazo (Cardozo et al., 2006).

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae, Leguminosae) é composto por aproximadamente 300 espécies, conhecidas popularmente como 'pata de vaca' ou 'casco de vaca', devido à forma das suas folhas. As espécies são largamente distribuídas em países tropicais, incluindo países da África, Ásia e América do Sul (Lewis et al., 2005). Suas folhas e a casca do caule têm sido utilizadas frequentemente na medicina popular como remédio para diferentes tipos de patologias, em particular diabetes, infecções e processos inflamatórios (Da Silva e Cechinel Filho, 2002; Cechinel Filho, 2009).

Na última década o interesse nestas plantas aumentou consideravelmente, especialmente no Brasil, uma vez que estudos experimentais sobre propriedades biológicas de diferentes espécies de *Bauhinia* e seus compostos isolados têm sido investigados em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Relatos sobre suas atividades biológicas têm gerado controvérsias, como por exemplo, o extrato etanólico de *Bauhinia platyptala* Burch., não apresentou efeitos citotóxicos em *S. cerevisiae*, mas apresentou tais efeitos juntamente com aumento de danos no DNA em células V79 (Santos et al., 2012). Componentes das folhas de *Bauhinia monandra* não induziram aumento na frequência de mutações reversas em cepas de *S. typhimurium* (TA97, TA98, TA100 e TA102) com e sem ativação metabólica (Sisenando et al., 2009). O extrato da casca de *Bauhinia variegata* L. mostrou efeito quimiopreventivo tanto *in vitro* (em linhagens tumorais HEP2 e HBL-100) quanto *in vivo* (em ratos Swiss albinos) (Raj Kapoor et al., 2006; Pandey e Agrawal, 2010). Segundo Cechinel Filho (2009), os estudos realizados com espécies deste gênero, em geral, confirmam suas propriedades terapêuticas, como por exemplo, um alto potencial antidiabético, indicando que estas propriedades são devidas, principalmente, à presença de flavonóides neste gênero de plantas.

Durante os últimos 30 anos tem sido uma prática comum realizar ensaios de curta duração com células *in vitro* para detecção de substâncias mutagênicas e antimutagênicas, diminuindo a utilização de animais. As células HepG2 (hepatocarcinoma humano) vêm sendo utilizadas e consideradas um ótimo modelo experimental *in vitro* (Knausmüller et al., 2004), pois estas células, ao contrário de outras linhagens, possuem enzimas induzíveis de metabolização de fase I e II, que são capazes de ativar e detoxificar xenobióticos, refletindo portanto, o metabolismo normal de seres humanos (Mersch-Sundermann, 2004).

Dada a importância de investigar plantas medicinais quanto ao seu potencial mutagênico e apoptótico em células humanas para a avaliação de perigo do seu uso pela população, e devido ao fato de até o momento não existirem relatos na literatura sobre a composição fitoquímica e os efeitos do extrato de *Bauhinia holophylla* em células de mamíferos *in vitro*, o objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis perigos do extrato etanólico obtido de folhas desta planta, por meio da análise de suas propriedades citotóxicas, mutagênicas, antimutagênicas, apoptóticas e efeitos na cinética do ciclo celular em células humanas metabolizadoras HepG2.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e Estudo Fitoquímico

Folhas (1,6 kg) de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. foram coletadas por Pieroni, L.G. no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da Rodovia Comandante João R. de Barros – SP 225 (22°20'30'' S e 49°00'30'' W) no mês de janeiro de 2011. A identificação da espécie foi realizada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vaz, A.M.S.F. do Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, taxonomista especialista no gênero. Exsiccatas foram incluídas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob números de registro RB 507.043, RB 507.045, RB 507.046, RB 507.47 e RB 507.048.

As folhas de *Bauhinia holophylla* foram secas em estufa a 45°C por 4 dias. Após a secagem, foram pulverizadas em moinho de facas. O extrato foi preparado por percolação exaustiva do pó (220 g). Após a extração, os líquidos extratores foram concentrados sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 50°C. O extrato foi transferido para vidros tarados e deixado em capela até completa eliminação dos solventes. Foram obtidos 65g de extrato hidroalcoólico (rendimento de 29,5%).

Para a obtenção do perfil químico do extrato hidroalcoólico (EtOH 70%) das folhas de *Bauhinia holophylla*, as amostras foram preparadas utilizando-se 50 mg do extrato das

folhas. O *clean-up* do extrato EtOH 70% foi realizado em cartucho de extração em fase sólida (SPE) (Strata-X, Phenomenex<sup>®</sup> - Torrance, CA - USA) de fase reversa (C<sub>18</sub>) com 500,0 mg de adsorvente. A concentração final foi de 1 mg da amostra para cada 10 mg de C<sub>18</sub>. A eluição foi realizada usando como fase móvel MeOH e H<sub>2</sub>O purificada, ambos acidificados com ácido acético 0,1% (água ultra pura + ácido acético 0,1% (A) e MeOH + ácido acético 0,1% (B); gradiente: 25% a 100% de B em A em 70 minutos).

Para o isolamento e identificação das substâncias, o EtOH 70% foi submetido à extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano - DCM e *n*-Butanol [*n*-BuOH]), obtendo-se frações semipurificadas. A fração *n*-BuOH (que extrai substâncias orgânicas) apresentou um perfil flavonoídico constituído por agliconas e alguns monoglicosídeos. Por isso, optou-se pela escolha da fração *n*-butanólica para fracionamento, isolamento e identificação de substâncias ativas e realização de HPLC-MS e FIA-EIS-IT-MS, por serem os flavonoides, substâncias de grande interesse químico e farmacológico.

Uma alíquota da fração *n*-BuOH (3,00 g) foi submetida à cromatografia por permeação em gel (GPC) em coluna de Sephadex LH-20 (Pharmacia<sup>®</sup> - Uppsala - Suécia). A amostra foi solubilizada em 20,00 mL de MeOH e centrifugada à 435 g/min por duas vezes, 8 minutos cada. O sobrenadante foi aplicado na coluna, utilizando-se MeOH como eluente. Foram coletadas 170 frações, posteriormente monitoradas por CCDc. As frações obtidas a partir do agrupamento foram analisadas novamente por CCDc e por HPLC-UV-PDA. Aquelas que apresentaram perfis de flavonoides foram submetidas a novos fracionamentos, dependendo da característica de cada amostra. As substâncias puras foram identificadas por RMN (ressonância magnética nuclear) em Espectrômetro Varian INOVA 500 (11,7 Tesla, Vernon Hills, IL - USA), operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H e a 125 MHz para <sup>13</sup>C. O TMS (Tetrametilsilano) foi usado como padrão interno para determinação dos deslocamentos químicos.

Posteriormente, após estas etapas químicas, uma fração do extrato hidroalcoólico seco de *Bauhinia holophylla* foi enviado para o Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL. O extrato foi diluído em etanol 70% (EtOH 70%) obtendo-se uma solução-estoque na concentração de 5000 µg/mL, que foi condicionado a -20 °C e sob ausência de luz, filtrado em membrana estéril e posteriormente diluído a partir da solução-estoque em dez diferentes concentrações para realização de outros ensaios.

## 2.2. Reagentes Químicos

B[a]P (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>; CAS: 50-32-8, Sigma-Aldrich - St. Louis – MO - USA) foi utilizado como controle positivo (CP) nos experimentos e foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO, CAS: 67-68-5, JT Baker - Center Valley – PA - USA), na concentração de 20 µM (504,00 µg/mL), seguindo o Guideline 487 da OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico), onde a concentração final de DMSO não excedeu 1% em meio de cultura.

Citocalasina B (CAS: 14930-96-2, C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>; Sigma-Aldrich St. Louis – MO - USA) foi diluída em DMSO para se obter uma solução-estoque concentrada de 2,00 mg/mL, que foi mantida a 4 °C na ausência de luz. Para a preparação da solução de uso, a solução estoque foi utilizada diluída em PBS (0,3 mg/mL) obtendo-se uma concentração final de 3,00 µg/mL de Citocalasina B em cultura durante a realização dos experimentos. Tais condições foram definidas previamente por nosso grupo de pesquisa.

Laranja de Acridina (CAS: 65-61-2, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>) e Brometo de Etídio (CAS: 1239-45-8, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis – MO - USA) e foram utilizados para a análise de células apoptóticas e necróticas. O sal de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) defenitetrazolium bromide, CAS: 298-93-1, C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S) foi obtido de Invitrogen (Eugene – OR - USA).

## 2.3. Linhagem Celular e Condições de Cultura

As células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL pelo Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP, USP - Brasil. As células HepG2 foram cultivadas em 10 mL de meio de cultura DMEM (Gibco, Grand Island - NY - USA) suplementado com 15% de soro bovino fetal -SBF (CAS: 12657-029, Gibco, Grand Island - NY - USA), 1% de solução antibiótico-antimicótico (CAS: 15240-062, Gibco, Grand Island - NY - USA) e 0,024% de bicarbonato de sódio (CAS: 144-55-8, Sigma-Aldrich, St-Louis – MO - USA), a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram conduzidos entre a terceira e a oitava passagem celular, sendo que as células HepG2 sob essas condições, possuem ciclo celular de aproximadamente 24 horas.

#### 2.4. Ensaio de Citotoxicidade – MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

O ensaio do MTT foi utilizado para determinação da citotoxicidade do extrato de *Bauhinia holophylla* em células HepG2, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983) com modificações. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>3</sup>, tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e 1x10<sup>4</sup> células foram colocadas por poço em placas de 96 poços em um volume de 200 µL de meio de cultura completo. Após estabilização de 24 horas o meio foi retirado e 10 diferentes concentrações do extrato (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg/mL) e o controle do solvente (EtOH 70%) foram aplicadas em meio de cultivo mínimo (ausência de SBF) para avaliação da citotoxicidade em células HepG2 (7 poços para cada concentração) nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Após os tratamentos, 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço e incubados por 4 horas. Por fim, o meio com a solução de MTT foi retirado e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro (Uniscience, São Paulo, SP - Brasil) a 550 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Os valores do controle negativo foram considerados como 100% para normalização dos dados obtidos.

#### 2.5. Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

O ensaio do micronúcleo (MN) foi realizado de acordo com o método descrito por Fenech (2007) com modificações (Citocalasina-B a 3 µg/mL; Citrato de Sódio 1% a 4°C como solução hipotônica; Formaldeído 25%; Giemsa 5%) e todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Primeiramente, 0,5x10<sup>6</sup> células HepG2 foram colocadas em cada frasco de cultura contendo 5 mL de meio completo e estabilizadas por 24 horas. Após a estabilização, as células foram tratadas da seguinte maneira: (i) três concentrações do extrato de *Bauhinia holophylla* (7,5, 15 e 30 µg/mL) por 24 horas para avaliação de mutagenicidade (ii) uma concentração do extrato (7,5 µg/mL) para ensaios de antimutagenicidade em protocolos associados com B[a]P de pré-tratamento (tratamento com extrato por 24h e depois B[a]P por 24h), tratamento simultâneo (tratamento com extrato e

B[a]P simultaneamente por 24h) e pós-tratamento (tratamento com B[a]P por 24h e depois com extrato por 24h). Depois dos tratamentos, as células foram incubadas por 30 horas com Citocalasina B (3 µg/mL) para obtenção de células binucleadas. Em todos os experimentos foram realizados controles negativo (PBS) e positivo (B[a]P/20 µM), sendo que para os ensaios de antimutagenicidade cada experimento teve seu respectivo controle. Na etapa de fixação, as células HepG2 foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS, tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 174 g/min. Logo após, o *pellet* foi ressuspensionado em solução hipotônica (citrato de sódio, CAS: 6132-04-3, Sigma-Aldrich, St.Louis – MO - USA, 1% a 4°C) e 30 µL de formaldeído a 25% por 4 minutos. As células foram centrifugadas novamente e fixadas duas vezes em solução de 3 mL : 1 mL de metanol:ácido acético. As células fixadas foram transferidas para lâminas previamente lavadas e mantidas em água destilada gelada para formação de um filme. As lâminas foram coradas com Giemsa (CAS: 1.09204.0500, Merck®, Rio de Janeiro – RJ - Brasil) a 5% diluído em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 M, pH 6.8, Merck®, Rio de Janeiro – RJ - Brasil) por 8 minutos e mantidas a 4 °C até o momento da análise microscópica em microscópio de luz Nikon. Para determinar a frequência de células com MNs foram analisadas 3000 células binucleadas com citoplasma preservado (1000 células por replicata). O critério de identificação de células binucleadas e MNs seguiu o descrito por Kirsch-Volders et al. (2000). A porcentagem de redução de danos (%R) no DNA foi obtida a partir da fórmula proposta por Waters et al. (1990) descrita abaixo:

$$\%R = \frac{[\%MN \text{ B[a]P}] - [\%MN \text{ Tratamento}]}{[\%MN \text{ B[a]P}] - [\%MN \text{ CN}]} \times 100$$

## 2.6. Índice de Divisão Nuclear – IDN

O Índice de Divisão Nuclear (IDN) foi determinado de acordo com o protocolo de Fenech (2007). Para cada experimento 500 células foram analisadas, e somente células com citoplasma preservado e que possuíam de 1 a 4 núcleos foram consideradas. Para o cálculo do IDN a seguinte fórmula de Eastmond e Tucker (1989) foi aplicada:

$$IDN = \frac{M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)}{N}$$

onde M1, M2, M3 e M4 correspondem ao número de células com um, dois, três e quatro núcleos respectivamente, e N é o número total de células viáveis analisadas.

## 2.7. Ensaio de Indução de Apoptose

A indução de apoptose pelo extrato de *Bauhinia holophylla* em células HepG2, bem como a possível proteção do extrato contra este evento, foram avaliados usando a técnica descrita por McGahon et al. (1995). Esta técnica baseia-se em uma coloração diferencial das células com os corantes fluorescentes Laranja de Acridina (LA) e Brometo de Etídeo (BE), que possuem a capacidade de distinguir células normais, células em apoptose inicial e final e células necróticas. No total,  $0,1 \times 10^6$  células foram colocadas em placas de 24 poços e foram tratadas seguindo-se os mesmos protocolos usados para os ensaios do MN. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e com controles negativo (PBS) e positivo (B[a]P a 20  $\mu$ M). Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas e 25  $\mu$ L da suspensão celular foram misturados com 10  $\mu$ L da solução de coloração (100  $\mu$ g/mL de LA e 100  $\mu$ g/mL de BE). O homogeneizado foi então colocado sobre lâminas limpas, coberto com lamínulas e 600 células por tratamento (200 por replicata) foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon, com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Para validação desses experimentos, o ensaio de exclusão por Azul de Trypan, que mede a viabilidade celular, foi utilizado. A porcentagem de redução (%R) de células apoptóticas também seguiu o descrito por Waters et al. (1990).

$$\%R = \frac{[\% \text{ apoptose B[a]P}] - [\% \text{ apoptose Tratamento}]}{[\% \text{ apoptose B[a]P}] - [\% \text{ apoptose CN}]} \times 100$$

## 2.8. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada de acordo com o protocolo de Ormerod (2000). No total,  $0,1 \times 10^6$  células foram colocadas em placas de 24 poços e foram tratadas seguindo-se os mesmos protocolos usados para os ensaios do MN. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com controles negativo (PBS) e positivo (B[a]P). Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, fixadas em 2 mL de solução etanol 70% e permaneceram no gelo por 30 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas a 174 g/min por 5 minutos e resuspendidas em 400  $\mu$ L de PBS. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de solução de RNase (1 mg/mL em água) e 50  $\mu$ L de solução de iodeto de propídeo (400  $\mu$ g/mL em água) e incubado a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram então submetidas ao separador de células com fluorescência ativada (FACS, FACSVantage, Becton Dickinson – Franklin Lakes

– NJ - USA) e os dados foram analisados utilizando-se o software Cell Quest (Becton Dickinson - Franklin Lakes – NJ - USA) e perfis do ciclo celular foram desenhados utilizando-se o software FlowJo (Tree Star Incorporation, Ashland – OR – USA).

## **2.9. Análise Estatística**

Os dados obtidos nos ensaios do MTT, CBMN, IDN e Apoptose foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os dados obtidos por citometria de fluxo foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunn. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 5 (La Jolla – CA – USA). Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com nível de significância  $\leq$  5%.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Dados Fitoquímicos**

O estudo da composição química da fração *n*-BuOH do extrato EtOH 70% das folhas de *Bauhinia holophylla* possibilitou o isolamento e identificação de 10 diferentes substâncias: um glicosídeo cianogênico, uma lactona, um heterocarboneto linear, quatro heterosídeos de quercetina, um heterosídeo de miricetina, uma aglicona de luteolina e uma aglicona de quercetina. Além das substâncias isoladas, os estudos por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS possibilitaram a detecção e identificação de mais 6 substâncias, que são: dois heterosídeos de miricetina, um heterosídeo de quercetina, um heterosídeo de kaempferol, um heterosídeo de luteolina e uma aglicona de isorhamnetina. A Tabela 1 apresenta todos os flavonoides identificados neste estudo.

**Tabela 1.** Flavonoides identificados no extrato etanólico das folhas de *Bauhinia holophylla* após utilização das metodologias de HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS.

<b>FLAVONOIDES</b>	
Apigenina-C-pentose	Quercetina
Isorhamnetina	Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo
Kaempferol-O-rhamnosídeo	Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinosídeo
Luteolina	Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo
Miricetina-O-hexose	Quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactosídeo
Miricetina-O-pentose	Quercetina-O-hexose
Miricetina-O-rhamnosídeo	Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosídeo
Miricetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosídeo	Quercetina-3-O- $\beta$ -D-xilopiranosídeo

### 3.2. Viabilidade Celular

A viabilidade celular após a realização do ensaio de Azul de Trypan foi sempre superior a 92% em todos os experimentos. O solvente utilizado para diluição do extrato não alterou a viabilidade em nenhum tempo de tratamento avaliado (dados não mostrados). A Figura 1 mostra as porcentagens de células HepG2 viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *Bauhinia holophylla* em diferentes tempos de tratamento no ensaio MTT. É possível observar que nos tempos de tratamento de 3 e 48 horas nenhuma concentração do extrato interferiu na viabilidade das células HepG2. Porém, em alguns tempos, como em 24 e 72 horas algumas concentrações demonstraram uma redução significativa da viabilidade celular. Portanto, as concentrações escolhidas para averiguar a indução de apoptose e mutagenicidade foram 7,50; 15,00 e 30,00  $\mu\text{g/mL}$ .

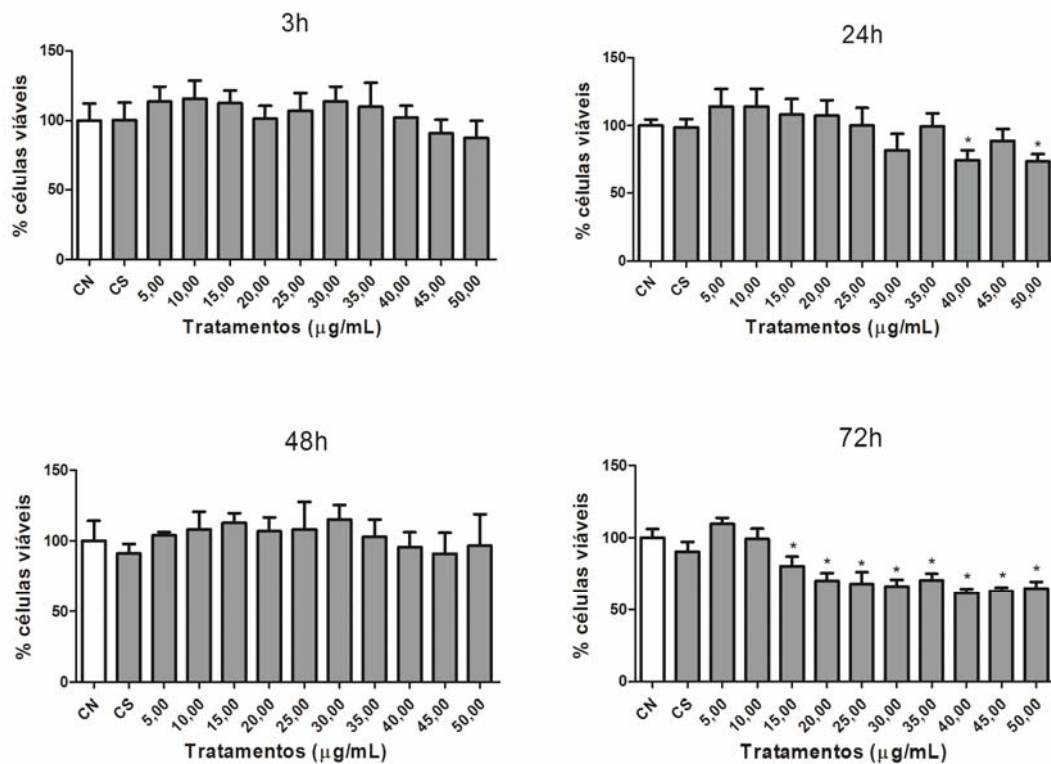


Figura 1. Viabilidade celular (%) observada em células HepG2 sob tratamento com diferentes concentrações do extrato de *Bauhinia holophylla* e em diferentes tempos no ensaio do MTT. Os resultados são expressos como uma porcentagem em relação ao grupo controle negativo. CN: controle negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CS: controle do solvente (etanol 70%).

\*Valores estatisticamente diferentes do controle negativo ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

### 3.3. Avaliação da Mutagenicidade

Foi verificado no teste do micronúcleo (Tabela 2), que nenhuma concentração do extrato etanólico de *Bauhinia holophylla* mostrou potencial mutagênico em células metabolizadoras humanas (HepG2). Ao se considerar os dados obtidos no IDN, as três concentrações deste extrato reduziram significativamente a proliferação celular. O teste de tendência linear ( $F= 37,73$  e  $p > 0,0002$ ) indicou que esta redução foi concentração-dependente. Todavia, deve-se considerar que no grupo EtOH 70% também foi observada uma redução significativa, o que deve ter contribuído para os dados obtidos com os tratamentos com o extrato.

Na avaliação de indução de apoptose, o aumento da frequência de células apoptóticas em relação ao controle negativo foi concentração-dependente, segundo o teste de tendência linear ( $F= 11,85$  e  $p < 0,0005$ ) e conforme demonstrado na Figura 2. Apesar desse aumento ter acontecido de forma dose-dependente, somente o resultado obtido com a maior concentração

(30 µg/mL) foi estatisticamente diferente do controle. Devido ao fato da concentração de 7,50 µg/mL ter apresentado a menor frequência de células micronucleadas em comparação ao grupo CN (Tabela 2) e de não ter induzido células apoptóticas (Figura 2), esta foi escolhida para avaliação do efeito protetor do extrato em células humanas HepG2.

**Tabela 2.** Frequência de células micronucleadas (MN) em 3000 células analisadas, índice de divisão nuclear (IDN) em 1500 células analisadas e % de células micronucleadas em células HepG2 submetidas ao tratamento com 3 concentrações do extrato de *Bauhinia holophylla* e seus respectivos controles após 24h de tratamento

Tratamentos (µg/mL)	Células micronucleadas				% céls. MNs	IDN			
	Repetições			X±SD		Repetições			X±SD
	I	II	III			I	II	III	
CN	16	22	17	18,33±3,22 <sup>a</sup>	1,83	1,770	1,710	1,692	1,724±0,041 <sup>a</sup>
CP	28	30	30	29,33±1,16 <sup>b</sup>	2,93	1,530	1,512	1,564	1,535±0,026 <sup>b</sup>
EtOH 70%	14	13	17	14,67±2,08 <sup>a</sup>	1,47	1,518	1,534	1,564	1,539±0,023 <sup>b</sup>
Extrato									
7,50	18	20	13	17,00±3,61 <sup>a</sup>	1,70	1,542	1,568	1,592	1,567±0,025 <sup>b</sup>
15,00	17	16	18	17,00±1,00 <sup>a</sup>	1,70	1,414	1,414	1,402	1,410±0,007 <sup>c</sup>
30,00	14	15	11	13,33±2,08 <sup>a</sup>	1,33	1,394	1,338	1,418	1,383±0,041 <sup>c</sup>

Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

X±SD = Média±Desvio Padrão; CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP = Controle Positivo (B[a]P 20µM); EtOH 70% = Etanol 70%.

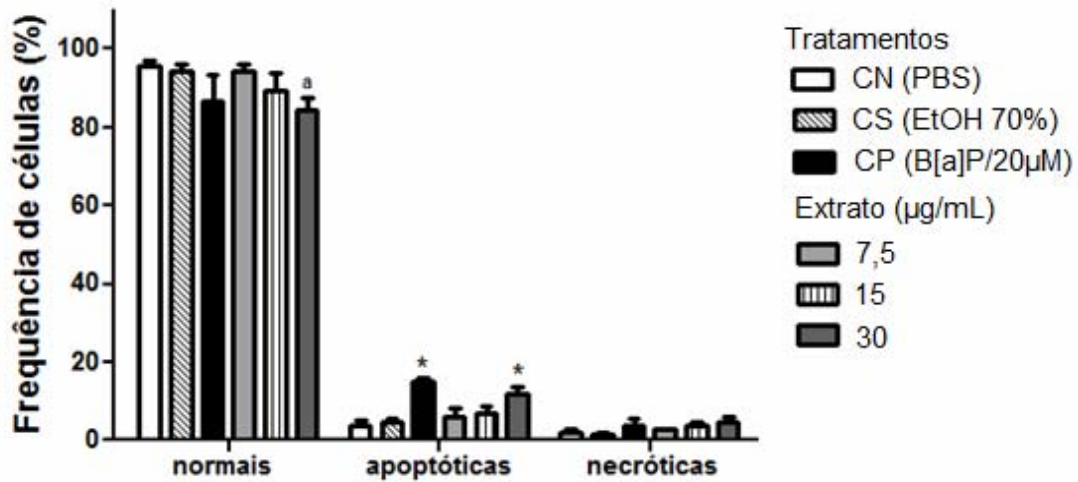


Figura 2. Frequência de células HepG2 (%) observadas após tratamento de 24 horas com diferentes concentrações do extrato de *Bauhinia holophylla* no ensaio de apoptose/necrose.

\*Valores estatisticamente iguais entre si e diferentes dos demais ao nível de 5%.

<sup>a</sup>Valor estatisticamente diferente do CN ao nível de 5%. CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino), CP = Controle Positivo (B[a]P 20µM); CS = Controle do Solvente (EtOH 70%).

### 3.4. Efeito Protetor (Ensaio de Antimutagenicidade)

Conforme demonstrado na Tabela 3, todos os tratamentos associados do extrato de *Bauhinia holophylla* com o B[a]P mostraram efeito protetor aos danos causados no DNA pelo B[a]P no ensaio do MN. A porcentagem de redução de MN variou de 75,5 a 83%, mostrando o potencial antimutagênico deste extrato. No pós-tratamento, apesar de ter sido observado 83% de redução de danos no DNA, o extrato inibiu também a proliferação celular. O extrato na concentração de 7,50 µg/mL em todos os protocolos de tratamento associados reduziu o IDN em relação ao CN, tendo o tratamento simultâneo apresentado IDN mais próximo ao do grupo CN.

**Tabela 3.** Frequência de células micronucleadas (MN) em 3000 células analisadas, índice de divisão nuclear (IDN) e porcentagem de redução de danos (%R) e células micronucleadas (% de céls. MNs) em 1500 células analisadas em células HepG2 submetidas a protocolos de tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento com extrato de *Bauhinia holophylla* associado com benzo(a)pireno (B[a]P) e seus respectivos controles positivo, negativo e solvente.

Tratamentos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Células micronucleadas				% céls. MNs	%R	IDN			
	Repetições			X $\pm$ SD			Repetições			X $\pm$ SD
	I	II	III				I	II	III	
<b>SIMULTÂNEO</b>										
CN	16	11	11	12,67 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	1,27		1,712	1,698	1,712	1,707 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>
CP	24	20	28	24,00 $\pm$ 4,00 <sup>b</sup>	2,40		1,394	1,454	1,404	1,417 $\pm$ 0,032 <sup>b</sup>
EtOH 70%	14	13	16	14,33 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	1,43		1,550	1,502	1,522	1,525 $\pm$ 0,024 <sup>c</sup>
SIM	15	15	16	15,33 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	1,53	76	1,608	1,646	1,594	1,616 $\pm$ 0,027 <sup>d</sup>
<b>PRÉ- TRATAMENTO</b>										
CN	11	14	14	13,00 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	1,30		1,682	1,650	1,620	1,651 $\pm$ 0,031 <sup>a</sup>
CP	32	31	29	30,67 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>	3,07		1,454	1,424	1,472	1,450 $\pm$ 0,024 <sup>b</sup>
EtOH 70%	15	15	16	15,33 $\pm$ 0,58 <sup>a,c</sup>	1,53		1,624	1,554	1,562	1,580 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup>
PRÉ	16	17	19	17,33 $\pm$ 1,53 <sup>c</sup>	1,73	75,5	1,422	1,516	1,448	1,462 $\pm$ 0,048 <sup>b</sup>
<b>PÓS- TRATAMENTO</b>										
CN	11	14	14	13,00 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	1,30		1,682	1,650	1,620	1,651 $\pm$ 0,031 <sup>a</sup>
CP	24	27	30	27,00 $\pm$ 3,00 <sup>b</sup>	2,70		1,416	1,332	1,342	1,363 $\pm$ 0,046 <sup>b</sup>
EtOH 70%	15	15	16	15,33 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	1,53		1,624	1,554	1,562	1,580 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup>
PÓS	15	15	16	15,33 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	1,53	83	1,440	1,384	1,456	1,427 $\pm$ 0,038 <sup>b</sup>

Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

X $\pm$ SD = Média $\pm$ Desvio Padrão;. CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP = Controle Positivo (B[a]P 20 $\mu\text{M}$ ); EtOH 70% = Etanol 70%.

Conforme apresentado na Figura 3, o extrato de *Bauhinia holophylla* também apresentou efeito protetor no ensaio de apoptose na maioria dos tratamentos associados quando comparado ao controle positivo. Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos de 3 horas onde as porcentagens de redução de células apoptóticas foram de 75%, 60% e 55% para, respectivamente, tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento. Já após 24 horas de tratamento, a porcentagem de redução de células apoptóticas foi de 51, 24 e 50%, respectivamente.

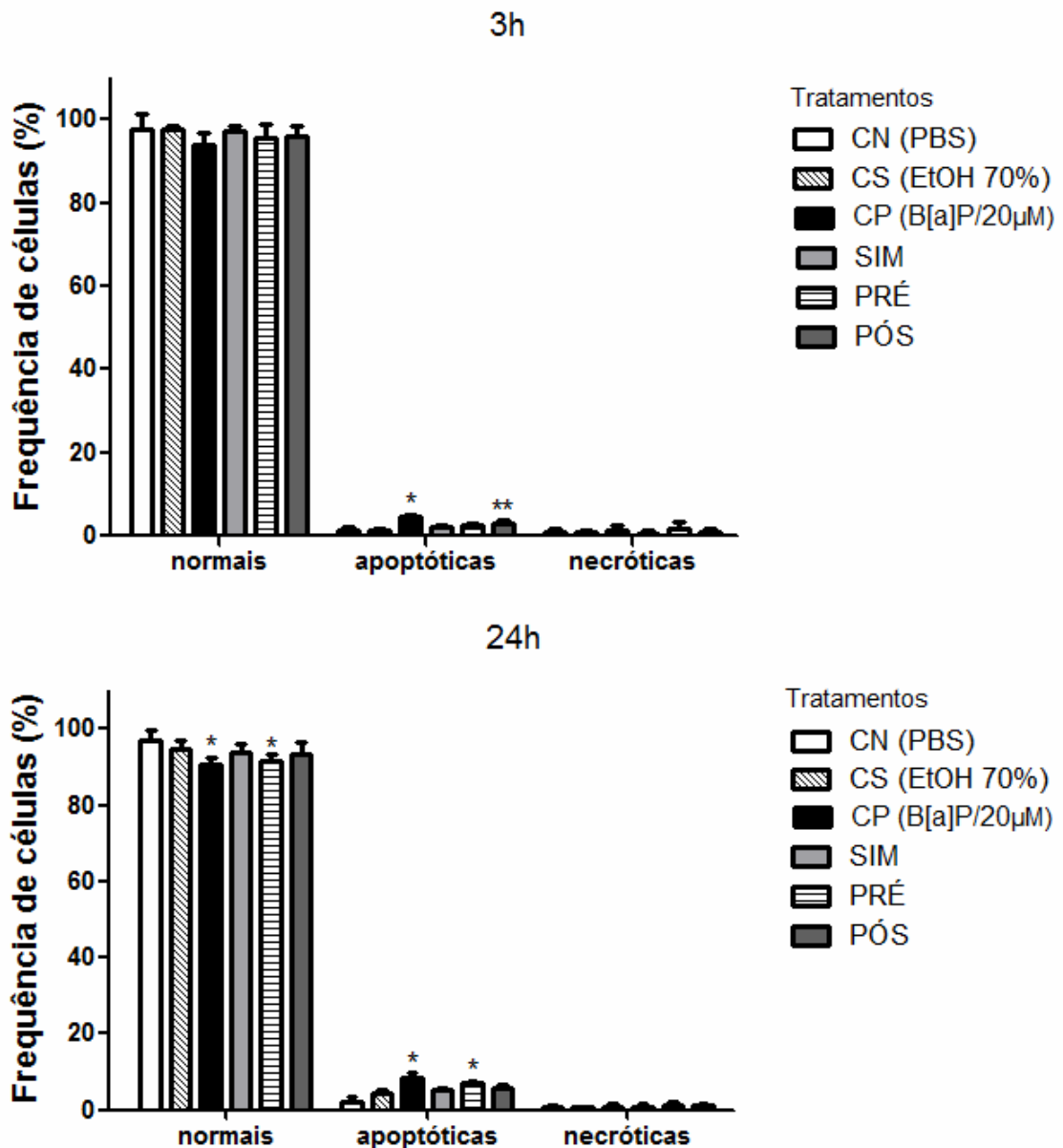


Figura 3. Viabilidade celular (%) observada após o ensaio de exclusão por Azul de Trypan e ensaio de Apoptose/Necrose em células HepG2 para tratamentos associados com o extrato de *Bauhinia holophylla* em tempo de tratamento de 3 horas e 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata totalizando 600 células analisadas por tratamento.

\* \*\* Valores estatisticamente diferentes dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CS = Controle do Solvente (EtOH 70%); CP = Controle Positivo (B[a]P 20µM); SIM = Tratamento Simultâneo; PRÉ = Pré-Tratamento; PÓS = Pós-Tratamento;

### 3.5. Análise de Ciclo Celular

Os resultados da análise de ciclo celular realizado por citometria de fluxo utilizando coloração diferencial com iodeto de propídeo estão demonstrados nas Figuras 4(a) e (b). Na Figura 4(a) observa-se que o extrato de *Bauhinia holophylla* nas três concentrações avaliadas diminuiu significativamente a população de células em fase G1 e aumentou significativamente a população de células na fase S, quando comparado ao CN. Isto demonstra um possível bloqueio de ciclo celular e diminuição da proliferação de células HepG2.

A avaliação do efeito protetor (Figura 4[b]), indicou que quando comparados os tratamentos associados com o B[a]P, os protocolos de tratamentos simultâneo e pós não alteraram a população de células na fase G1 mas aumentaram a população de células em fase S do ciclo celular em relação ao tratamento com B[a]P. Em pré-tratamento, foi verificado um aumento da população de células em fase G1 e uma diminuição da população G2/M.

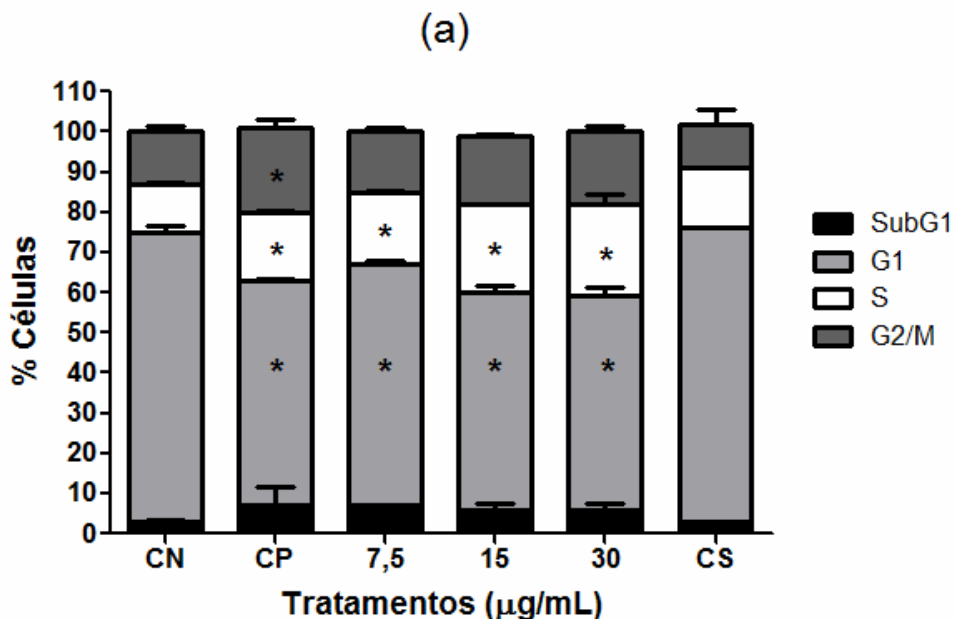


Figura 4a. Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se análise por citometria de fluxo em células HepG2 para tratamentos com o extrato de *Bauhinia holophylla*.

\*Valores estatisticamente diferentes do CN em sua respectiva fase ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Dunnet.

CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CP = Controle Positivo (B[a]P 20µM); CS = Controle de Solvente (EtOH 70%).

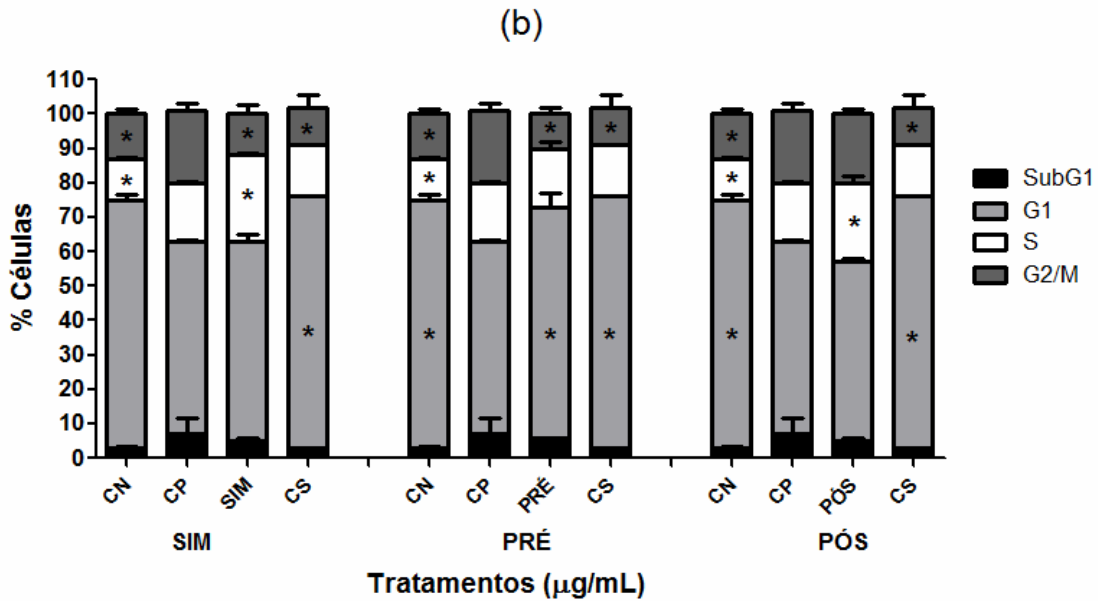


Figura 4b. Frequência de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se de análise por citometria de fluxo em células HepG2 para tratamentos associados com extrato de *Bauhinia holophylla* e B[a]P.

\*Valores estatisticamente diferentes do CP em sua respectiva fase ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

CN = Controle Negativo (PBS: Tampão Fosfato Salino); CS = Controle do Solvente (EtOH 70%); CP = Controle Positivo (B[a]P 20 $\mu$ M); SIM = Tratamento Simultâneo; PRÉ = Pré-Tratamento; PÓS = Pós-Tratamento.

#### 4. DISCUSSÃO

A quantidade de produtos naturais consumida pela população, como chás e fitoterápicos, vem aumentando constantemente, principalmente em lugares onde a medicina popular é tradicionalmente utilizada no tratamento de doenças crônicas. Muitas plantas medicinais existentes podem prover um alívio ou cura dos sintomas de uma determinada doença, sendo comparadas a medicamentos tradicionais. Porém, a avaliação do potencial genotóxico destas plantas é necessária e importante para aumentar a segurança relativa do seu uso por seres humanos (Surh e Ferguson, 2003).

Devido a isso, a avaliação de perigo de plantas como *Bauhinia holophylla* ainda é necessária, pois de acordo com nosso conhecimento, não há nenhum dado ou trabalho sobre ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade, antimutagenicidade, apoptose e cinética de ciclo celular deste extrato em células de mamíferos. No entanto, há relatos de atividades biológicas ainda controversas para outras espécies do mesmo gênero, como por exemplo, o estudo de Bresolin e Vargas (1993) que demonstrou que o extrato de *Bauhinia forficata* foi capaz de induzir mutagenicidade na linhagem TA102 de *S. typhimurium* após metabolização com

fração S9 em ensaios *in vitro*. Nossos dados, entretanto, não corroboram este estudo, pois nas células HepG2 o extrato de *Bauhinia holophylla* não apresentou mutagenicidade em 3 concentrações avaliadas. Apesar de nos dois trabalhos ter havido a possibilidade de metabolização dos extratos, deve-se ressaltar que estes eram provenientes de espécies distintas do gênero *Bauhinia* e, além disso, o parâmetro avaliado pelos autores foi um teste de mutação gênica (teste de Ames), enquanto no presente estudo, o parâmetro foi um teste de mutação cromossômica (teste do MN).

Outro exemplo a ser citado é o trabalho de Santos et al. (2012), que também não observaram genotoxicidade do extrato de *Bauhinia platyptala* em células V79 *in vitro*; porém, os autores obtiveram resultados positivos quando avaliaram concentrações acima de 50 µg/mL. No presente estudo, concentrações acima de 30 µg/mL não foram avaliadas em ensaios de mutagenicidade. No entanto, as concentrações avaliadas neste estudo (7,5, 15 e 30 µg/mL) demonstraram uma frequência de células micronucleadas semelhante à obtida para o grupo controle negativo, fortalecendo assim a hipótese de ausência de mutagenicidade deste extrato.

Cechinel Filho (2009) ao fazer uma revisão sobre a composição química e o potencial biológico de diferentes plantas do gênero *Bauhinia*, demonstrou que os compostos majoritários presentes nestas plantas são os flavonoides, que possuem enorme potencial para tratamento de diabetes, porém, variam de espécie para espécie, o que explica a obtenção de diferentes resultados. O estudo fitoquímico do extrato etanólico utilizado no presente estudo também apresentou uma grande quantidade de compostos fenólicos, mais especificamente, derivados de flavonoides, destacando-se miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol e isorhamnetina.

O fato do extrato em estudo ter sido capaz de proteger o DNA das células HepG2 contra os danos causados pelo B[a]P, permite supor que os constituintes químicos presentes no extrato etanólico de *Bauhinia holophylla* possivelmente possuam efeito antioxidante e quimioprotetor. No entanto, essa hipótese ainda deve ser confirmada por outros estudos, como os que empregam compostos isolados para caracterização de efeitos protetores.

B[a]P é um pré-carcinógeno conhecido, encontrado na fumaça do cigarro, alimentos cozidos e em combustíveis. Durante o processo metabólico, como o que ocorre em células HepG2, o B[a]P pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e metabólitos eletrofilicos por meio da atividade da enzima citocromo P4501A1 (CYP1A1) (Burczynski e Penning, 2000). Estes metabólitos podem causar danos oxidativos no DNA e formarem

aductos nesta molécula, além de causarem danos a outras estruturas celulares (Shiizaki et al., 2013).

Segundo Birt et al. (2001), danos oxidativos no DNA são uma importante causa de mutações, que podem potencialmente serem reduzidas por antioxidantes alimentares como flavonoides e isoflavonas. O potencial antioxidante destes doadores de elétrons já foi comprovado em cultura de células *in vitro* e em sistemas livres de células em que eliminaram espécies reativas de oxigênio (EROs). Delgado et al. (2008) comprovaram que compostos fenólicos da dieta, como miricetina e a quercetina, foram capazes de proteger o DNA de células HepG2 contra quebras no DNA e oxidação de pirimidinas induzidas por B[a]P. Estes dois flavonóides estão presentes na constituição fitoquímica de *Bauhinia holophylla*, e devem contribuir para os efeitos protetores observados para apoptose e MNs, quando o extrato foi associado com o B[a]P.

Estudos demonstram também que flavonoides e polifenóis podem ainda diminuir a produção de metabólitos reativos de xenobióticos por meio da regulação de enzimas CYPs relevantes, o que pode interferir diretamente na formação de aductos no DNA (Hatch et al., 2000). Este efeito biológico é outro fator que pode ajudar a explicar as altas porcentagens de redução de danos no DNA e do número de células apoptóticas nos tratamentos associados, principalmente em pré-tratamento, onde estes flavonóides podem ter interferido na metabolização do B[a]P. Nossos dados confirmam os estudos de Kanawaza et al. (1998) que relataram que alguns flavonóides como luteolina, kaempferol, quercetina e miricetina têm grande potencial e seletividade para inibição de isoformas CYP1A, pois estes constituintes químicos foram encontrados em grande quantidade no extrato etanólico de *Bauhinia holophylla*.

Foi observado em pós-tratamento de 3 e 24 horas redução da frequência de MNs e de células apoptóticas. O que pode ter contribuído para este efeito protetor de *Bauhinia holophylla*, é o fato de que, somado à inibição de enzimas de metabolização de fase I, flavonoides também podem induzir enzimas metabolizadoras de fase II, tais como glutationas-S-transferases (GSTs), NAD(P)H:quinona oxidoreduases (NQOs) e UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), por meio das quais substâncias cancerígenas são detoxificadas, podendo se tornar metabólitos intermediários menos reativos e diminuir as lesões no DNA (Galati et al., 2000; Delgado et al., 2008).

Outro dado relevante é que compostos naturais como os flavonoides, por meio de sua atividade antioxidante, também são capazes de ajudar na prevenção de danos ao DNA através da modulação de vias do reparo do DNA, fazendo com que, mesmo após o dano causado, este

seja reparado e as células mantenham seu DNA íntegro (De Flora, 1998; Collins et al., 2003). Os dados do presente estudo corroboram outros estudos publicados com flavonoides como miricetina, quercetina, apigenina, e luteolina, que demonstraram efeito antimutagênico e estimularam reparo de DNA após danos oxidativos causados em sistemas de cultura *in vitro* (Ramos et al., 2008; Hayder et al., 2008; Ramos et al., 2010; Das et al., 2013).

Por fim, foi verificado que o extrato etanólico de *Bauhinia holophylla* não apresentou efeitos citotóxicos, porém demonstrou alto potencial antiproliferativo sobre células HepG2 em tratamentos isolados ou associados ao B[a]P, como foi possível observar no Índice de Divisão Nuclear (IDN) e em citometria de fluxo, principalmente nas maiores concentrações avaliadas. O aumento significativo da população de células em fase S em praticamente todos os protocolos de tratamento (associados ou não) pode ser decorrente de um bloqueio da síntese de DNA e da replicação celular causados pelos flavonoides constituintes do extrato, o que acarretou na diminuição do número de células que completaram a divisão conforme também demonstrado pelos IDNs obtidos no teste do MN. Nossos dados corroboram estudos de outros autores, que demonstraram que flavonoides presentes também na constituição química deste extrato, como luteolina (Tsui et al., 2012), quercetina (Zhang et al., 2012) e miricetina (Zhang et al., 2010), interromperam o ciclo celular em fase S e diminuíram a proliferação em culturas celulares. Além disso, o aumento da população de células em fase S do ciclo celular em relação ao tratamento com B[a]P, indica que não houve recuperação da cinética do ciclo celular alterada pelo B[a]P. No entanto, em condição de pré-tratamento, foi verificado um aumento da população de células em fase G1 e uma diminuição da população G2/M, indicando uma tendência à recuperação dos efeitos causados pelo B[a]P na cinética do ciclo celular.

Considerando os parâmetros e condições empregadas neste estudo, é possível afirmar que os dados obtidos são de grande relevância, pois indicam que o uso do extrato de *Bauhinia holophylla* possivelmente não acarreta efeitos adversos às células humanas. Além disso, o extrato apresentou efeitos protetores que podem estar relacionados com uma possível ação quimiopreventiva contra agentes carcinogênicos, como o B[a]P. Entretanto, apesar dos resultados relevantes obtidos em células metabolizadoras humanas, uma análise dos mecanismos moleculares de ação deste extrato neste mesmo tipo celular e também ensaios *in vivo* devem ser realizados para comprovar tais efeitos e assegurar com precisão, a ausência de perigo do uso desta planta medicinal.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES-PROAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida ao aluno Ribeiro, D.L. e produtividade à Cólus, I.M.S. Os autores agradecem à Profa. Dra. Itano, E.N. pelo uso do espectrofotômetro, e ao Serviço de Citometria de Fluxo e Classificação Celular do Instituto de Investigações Biológicas Clemente Estable pela utilização do citômetro de fluxo FACSVantage.

## 6. REFERÊNCIAS

- Birt, D. F., 2001. Soybeans and cancer prevention: a complex food and a complex disease. In: Proceedings of the American Institute for Cancer Research, New Insights into the Role of Phytochemicals. New York: Plenum: Kluwer.
- Burczynski, M. E., Penning, T. M., 2000. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Research*. 60, 908–915.
- Bresolin, S., Vargas, V.M.F., 1993. Mutagenic potencies of medicinal plants screened in the Ames test. *Phytotherapy Research*. 7, 260–262.
- Cardozo, T.A., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., D'Avila de Oliveira, N.C., Pereira, T.S., Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F., 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research*. 603, 83–96.
- Cechinel Filho, V., 2009. Chemical Composition and Biological Potential of Plants from the Genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research*. 23, 1347–1354.
- Collins, A.R., Harrington, V., Drew, J., Melvin, R., 2003. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis*. 24, 511–515.
- Da Silva K. L., Cechinel Filho, V., 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quimica Nova*. 25, 449–454.

Das, S., Das, J., Paul, A., Sammader, A., Khuda-Bukhsh, A. R., 2013. Apigenin, a Bioactive Flavonoid from *Lycopodium clavatum*, Stimulates Nucleotide Excision Repair Genes to Protect Skin Keratinocytes from Ultraviolet B-Induced Reactive Oxygen Species and DNA Damage. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 6, 252-262.

De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*. 402, 151–158.

Delgado, M. E., Haza, A. I., Arranz, N., García, A., Morales, P., 2008. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *European Journal of Nutrition*. 47, 479–490.

Eastmond, D. A., Tucker, J. D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 13, 34–43.

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2, 1084–1104.

Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P. J., 2000. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 17, 311–349.

Hatch, F.T., Lightstone, F.C., Colvin, M.E., 2000. Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 279-299.

Hayder, N., Bouhleb, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariotte, M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M-G., Chekir-Ghedira, L., 2008. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-*o*-galactoside and myricetin-3-*o*-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology In Vitro*. 22, 567:581.

Kanazawa, K., Yamashita, T., Ashida, H., Danno, G., 1998. Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 62, 970–977.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Lorge, E., Norppa, H., Surrales, J., Von der Hude, W., Wataka, A., 2000. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 167–172.

Knasmuller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B. J., 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*. 198, 315–328.

Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Lock, J. M., 2005. *Legumes of the world*, Kew: Royal Botanic Gardens.

McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboudi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., Green, D. R., 1995. The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*. In: Schurartz, L. M., Osbourne, B. A. (Eds.), *Methods in cell biology*. Academic Press, San Diego, CA. pp.153–184.

Mersch-Sundermann, V., Knasmuller, S., Wu, X-j., Darroudi, F., Kassie, F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. 198, 329-340.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Obici, S., Otobone, F.J., Sela, V.R.S., Ishida, K., Silva, J.C., Nakamura, C.V., Cortez, D.A.G., Audi, E.A., 2008. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 115, 131–139.

OECD, *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit)*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 487, OECD, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>, 2010.

Pandey, S., Agrawal, R.C., 2010. Clastogenic Analysis of *Bauhinia variegata* Bark Extract Using Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow Cells. *American-Eurasian Journal of Toxicology Science*. 2, 112-114.

Rajkapoor, B., Jayakar, B., Muruges, N., Sakthisekaran, D., 2006. Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against *N*-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 104, 407–409.

Ramos, A.A., Lima, C.F., Pereira, M.L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2008. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*. 177, 66-73.

Ramos, A.A., Pereira-Wilson, C., Collins, A.R. 2010. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutation Research*. 692, 6-11.

Santos, F.J.B.D., Moura, D.J., Péres, V.F., Sperotto, A.R.M., Camarão, E.B., Cavalcante, A.A.C.M., Saffi, J., 2012. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*. 144, 474–482.

Shiizaki, K., Kawanishi, M., Yagi, T., 2013. Dioxin suppresses benzo[*a*]pyrene-induced mutations and DNA adduct formation through cytochrome P450 1A1 induction and (±)-anti-benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inactivation in human hepatoma cells. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 750, 77-85.

Sisenando, H.A.A.A.C.N., Macedo, M.F.S., Saturnino, A.C.R.D., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., 2009. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). *Food and Chemical Toxicology*. 47, 303–308.

Surh, Y.J., Ferguson, L.R., 2003. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens : molecular mechanisms and chemopreventive potential - highlights of a symposium. *Mutation Research*. 1–8, 523–524.

Tsui, K. H., Chung, L.C., Feng, T.H., Chang, P.L., Juang, H.H., 2012. Upregulation of prostate-derived Ets factor by luteolin causes inhibition of cell proliferation and cell invasion in prostate carcinoma cells. *International Journal of Cancer*. 130, 2812-2823.

Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Van Puyvelde, L., DeKimpe, N., Van Staden, J., 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicology In Vitro*. 18, 29–35.

Waters, M. D., Brady, A.L., Stack, H. F., Brockman, H. E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 238, 57-85.

Zhang, H., Zhang, M., Yu, L., Zhao, Y., He, N., Yang, X., 2012. Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1589-1599.

Zhang, X., Ling, Y., Yu, H., Ji, Y., 2010. Studies on mechanism of myricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 35, 1046-1050.

## 5 CONCLUSÕES

- Em relação ao extrato de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld podemos concluir que:
  - ✓ As menores concentrações (0,6, 2,4 e 9,7 µg/mL) não diminuíram a viabilidade celular
  - ✓ Induções de apoptose ou MNs não foram observadas em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, nas três concentrações avaliadas o IDN e a cinética do ciclo celular por citometria de fluxo indicaram, respectivamente, uma diminuição da proliferação celular e bloqueio do ciclo celular.
  - ✓ O efeito protetor da concentração de 2,4 µg/mL em protocolos associados (simultâneo, pré e pós-tratamento) com B[a]P demonstrou redução de células apoptóticas e micronucleadas, predominantemente em protocolos de pré e pós-tratamento, indicando que o extrato agiu prevenindo contra os danos causados pelo B[a]P.
  - ✓ A citometria de fluxo mostrou que o extrato induziu bloqueio do ciclo celular na fase G2/M em todos os tratamentos realizados com o extrato e em associação com o B[a]P (com exceção apenas da concentração de 9,7 µg/mL).
  - ✓ Os compostos majoritários presentes no extrato, como os antioxidantes apigenina e luteolina, podem explicar os efeitos protetores observados, pois esses componentes podem inibir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e impedir o processo apoptótico e a indução de danos no DNA, mas também podem alterar a cinética do ciclo celular e diminuir a proliferação de células HepG2.
  
- Em relação ao extrato de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. podemos concluir que:
  - ✓ a citotoxicidade foi verificada somente nas maiores concentrações avaliadas pelo ensaio do MTT.

- ✓ não houve indução de células micronucleadas em comparação ao controle negativo (CN) em qualquer das concentrações selecionadas (7,5; 15 e 30 µg/mL).
- ✓ após tratamento das células por 24 horas foi observada uma redução da proliferação celular em todas as concentrações avaliadas de forma concentração-dependente do extrato e a concentração de 30 µg/mL promoveu apoptose.
- ✓ foi observada uma redução significativa de células apoptóticas e micronucleadas em todos os tratamentos associados. A presença de flavonóides identificados no extrato (miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e isorhamnetina) podem explicar os efeitos protetores, pois estes compostos já foram anteriormente descritos como antioxidantes, inibidores da formação de aductos no DNA e ativadores de enzimas detoxificantes.
- ✓ ao se analisar a cinética do ciclo celular foi observado, em todos os protocolos combinados, um aumento da população de células em fase S, o que pode ser atribuído também à presença de alguns flavonoides, que possuem efeitos antiproliferativos em células humanas, principalmente em altas concentrações.

### **Conclusão Geral**

Após a realização deste estudo é possível afirmar que os extratos etanólicos de duas plantas do cerrado (*Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld., utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças crônicas, demonstraram (i) ausência de perigo a células humanas e (ii) possível eficácia quimiopreventiva contra danos causados por agentes mutagênicos ambientais como o B[a]P, devido provavelmente à riqueza de flavonoides em ambos extratos estudados. Devido aos extratos terem apresentado atividade antiproliferativa e causado alterações na cinética do ciclo de células HepG2, suas utilizações como quimiopreventivos devem ser recomendadas com cuidado para evitar qualquer tipo de efeito adverso.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S.K.; ECKHARDT, A.; OLI, G.R.; STOPPER, H. Analyses of *in vitro* chemoprevention of genotoxic damage by phytochemicals, as singles agents or as combination. **Mutation Research**, Amsterdam, v.744, p.117-124. Mai. 2012.
- AKAN, Z.; GARIP, A. I. Antioxidants may protect cancer cells from apoptosis signals and enhance cell viability. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Korea, v.14, n.8, p.4611-4614. Set.2013.
- BERNHARD, D; SCHWAIGER, W; CRAZZOLARA, R; TINHOFER, I; KOFLER, R. e CSORDAS, A. Enhanced MTT - reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, Heidelberg, v. 195, p.193-199. 10.jun. 2003.
- BICALHO, G.O.D.; CARDOSO, M.G.; SILVA, V.F.; MUNIZ, F.R.; DE CASTRO, E.M.; GAVILANES, M.L. Estudo morfológico das folhas de *bauhinia holophylla* (Steud.). **Caderno de Pesquisa - Série Biológica**, Santa Cruz do Sul, v. 17, n.1, p.13-19. 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2004. **Resolução RDC nº 48, Registro de Medicamentos Fitoterápicos, de 16 de março de 2004**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, Brasília, DF. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. 2009. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, Brasília, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2010. **Instrução Normativa nº5 – Eficácia de Medicamentos Fitoterápicos. ANVISA de 31 de março de 2010**. Disponível em: <[http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/instrucao05\\_31\\_03\\_10.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/instrucao05_31_03_10.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- BRIGATI, C.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A; BENELLI, R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?. **Clinical & Experimental Metastasis**, Sutton, v.19, p.247–258, Jun. 2002.

BURHANS, W.C.; WEINBERGER, M.; MARCHETTI, M.A.; RAMACHANDRAN, L.; D'URSO, G.; HUBERMAN, J. A. Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. **Mutation Research**, Amsterdam, v.532, p. 227-243. 27.nov.2003.

CARVALHO, J. C. T. **Formulário médico-farmacêutico de fitoterapia**. 3<sup>o</sup>ed., Editora Pharmabooks, São Paulo – SP, 2012.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 99-105. 20. Fev.1998.

CHATTOPADHYAY, P. K.; PRICE, D. A.; HARPER, T. F.; BETTS, M. R.; YU, J.; GOSTICK, E.; PERFETTO, S. P.; GOEPFERT, P.; KOUP, R. A.; DE ROSA, S. C.; BRUCHEZ, M. P.; ROEDERER, M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. **Nature Medicine**, New York, v.12, p.972–977. 23 Jul. 2006.

CHATTOPADHYAY, P. K.; HOGERKORP, C.; ROEDERER, M. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. **Immunology**, Oxford, v.125, p.441–449. Dec. 2008.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, New York, v.420, p.19-26, Dez. 2002.

DE FEUDIS, F. V.; PAPADOPOULOS, V.; DRIEU, K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, , v.17, Paris, p.405-417. Jul. 2003.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI F.; BALANSKY, R.M.; NOONAN, D.; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. **Mutation Research**, Amsterdam, v.480–481, p.9–22. Set. 2001.

DI GIORGIO, C.; BENCHABANE, Y.; BOYER, G.; PICCERELLE, P.; DE MÉO, M. Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.2773-2779. Nov. 2011.

DURGO, K.; KOSTIĆ, S.; GRADIŠKI, K.; KOMES, D.; OSMAK, M.; FRANEKIĆ, J. Genotoxic Effects of Green Tea Extract on Human Laryngeal Carcinoma Cells *In Vitro*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 62, n. 2, p.139-146. Jun. 2011.

EATON, D. L.; GILBERT, S. G. Princípios de Toxicologia, In: **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**, C. D. KLAASSEN; J. B. WATKINS (Eds.), 2<sup>o</sup> ed., Porto Alegre: Editora AMGH, p.5-10. 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, Newark, v.35, n.4, p.495-516. Jun. 2007.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALES, J.; CROFT, J.; PARRY, J.; NORPPA, H. Molecular mechanisms of micronucleus,

nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in human cells. **Mutagenesis**, Oxford, v.26, p.125–132. Ago. 2011.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.147, p.29–36. Fev-Abr.1985.

FERGUSON, L. R.; PHILPOT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, Amsterdam, v.198, p.147–159. Mai.2004.

FILARDI, F. L. R. 2013. *Machaerium*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23059>>. Acesso em: 08 out. 2013.

FORNELLI, F.; MINERVINI, F.; LOGRIECO, A. Cytotoxicity of Fungal Metabolites to Lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) Cell Line (SF-9). **Jornal of Invertebrate pathology**, Riverside, v. 85, p. 74-79. Fev. 2004.

FRESHNEY, I. Application of cell culture to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, Londres, v. 17, p. 213-230. Ago. 2001.

GRIPPI, S. **Lixo, Reciclagem e sua história**. 2º ed. Rio de Janeiro, Ed. Interciência, 166 p, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1999. **Free radicals in biology and medicine**: Oxford University Press, Oxford, UK.

HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; CASSANI-GALINDO, M.; MADRIGAL-BUJADAR, E. Antigenotoxic Effect of Chamomilla recutita (L.) Rauschert Essential Oil in Mouse Spermatogonial Cells, and Determination of Its Antioxidant Capacity *in Vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.11, p.3793-3802. Set. 2010.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, Londres, v.2, p.12-86, Jul. 2013.

KHAN, N. P.; NAG, T. N.; CHANDRAJAIN, S.; MOHAN, S. Process for isolation of insulin from plant source. **United States Patent**, v.3, p.945-988. 1976.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, p.137–148. Jul. 2002.

KIRSCH-VOLDERS, M.; DECORDIER, I.; ELHAJOUJI, A.; PLAS, G.; AARDEMA, M. J.; FENECH, M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D skin models. **Mutagenesis**, Oxford, v.26, p.177–184. Jan. 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; VANDE LOOCK, K.; DECORDIER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and

toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, Berlin, v.85, p.873–899. Ago. 2011.

LEE, K. W.; BODE, A. M.; DONG Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. **Nature Reviews in Cancer**, New York, v.11, p.211–218. Mar. 2011.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, 2005.

MARTINS, M. V. **Leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista, Brasil**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Taxonomia vegetal. Botucatu-SP, 2009.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, Paris, v.88, p.1515–1531. Nov. 2006.

McGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUDI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *In Vitro*, In: **Methods in Cell Biology**, L. M. SCHURARTZ, B. A. OSBOURNE (Eds.), Academic Press, v. 46, p.153-184. 1995.

MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come?. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v.27, p. 950–961. Jun. 2010.

MEYER, M.; SCHEPER, T.; WALTER, J-G. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 97, p.7097-7109. Ago. 2013.

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

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, Palo Alto, v.41, n.1, p.367-401. 2001.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, Oxford, v.18, p.221–233. Mai. 2003.

NURSE, P.; HAYLES, J. The cell in an era of systems biology. **Cell**, Cambridge, v.144, p.850–854. Mar. 2011.

OLIVEIRA, A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; XAVIER NETO, J.; PEREIRA, A. C.; VIEIRA, J. G. H.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER FILHO, J. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. **Protein & Peptide Letters**, Gainesville, v.6, p.15-21. Abr. 1999.

PANIZZA, S. **Plantas que Curam (Cheiro de Mato)**. 15ª ed. São Paulo, Ed. Ibrasa, 279 p, 1997.

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.58, n.2, p.313-329, Jan. 2007.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, p. 175-176, 2004.

RAFTER, J.J. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: Cancer. **British Journal of Nutrition**, Londres, v.88, p.219–224. Nov. 2002.

RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death? **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v.75, n.1, p.153-177. Sep. 1997.

RUDD, V. E. The genus *Machaerium* (Leguminosae) in Mexico. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v.37, p.119-146. 1977.

SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I.M.S. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* da citotoxicidade, genotoxicidade e dos efeitos protetores de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro**. 2008. Dissertação de Mestrado (Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, 2008.

SOUZA, V. C. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado das fanerógamas nativas e exóticas no Brasil baseado no APGIII. In: CASTRO, V.S.; LORENZI, H. 2º Edição, Nova Odessa, São Paulo, 2008.

STONER, G.D. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. **Cancer Prevention Research**, Philadelphia, v.2, p.187–194. Mar. 2009.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews in Cancer**, New York, v.3, n.10, p.768-780. Out, 2003.

TIRZITIS, G.; BARTOSZ, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.57, p. 139-142, Mai. 2010.

VAZ, A. M. S. F. 2013. *Bauhinia*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB111840>>. Acesso em: 08 out. 2013.

YANG, S.; MA, J.; XIAO, J.; LV, X.; LI, X.; YANG, H.; LIU, Y.; FENG, S.; ZHANG, Y. Arctigenin anti-tumor activity in Bladder cancer T24 cell line through induction of cell-cycle arrest and apoptosis. **The Anatomical Record**, Malden, v.295, p.1260-1266. Ago.2012.

## 7 APÊNDICES

### 7.1 Normas da Revista *Toxicology in Vitro*.



#### Introduction

##### Types of paper

The Journal's main purpose will be the publication of papers reporting and interpreting original toxicological research involving the application or development of in vitro techniques. Brief Communications (2,500 word limit) documenting important new findings warranting expeditious publication will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the Journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. *Toxicology in Vitro* also welcomes Correspondence from the scientific community, especially as they relate to Hot Topics and Debates. These are handled directly by the Editor-in-Chief and may be accompanied by responses.



#### Before You Begin

##### Ethics in publishing

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

##### Conflict of Interest

*Toxicology in Vitro* follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission:

1. All third-party financial support for the work in the submitted manuscript.
2. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript.
3. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission.
4. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported.
5. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued).
6. Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#), or at [http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

##### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other

language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

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

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

#### *For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

#### *For Open Access articles*

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

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### **Role of the Funding Source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding Body Agreements and Policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of

their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

### Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

#### Subscription

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

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

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

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### Language (usage and editing services)

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

## Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

<http://ees.elsevier.com/tiv>

**Questions about submission may be directed to the appropriate editor.**

Americas and Canada: [daniel.acosta@uc.edu](mailto:daniel.acosta@uc.edu)

Europe: [b.blaauboer@uu.nl](mailto:b.blaauboer@uu.nl)

All other areas of the world: [daniel.dietrich@uni-konstanz.de](mailto:daniel.dietrich@uni-konstanz.de)

## Revised versions

The medium of submission for revised papers is electronic, through the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/tiv>). Figures should be submitted as original high quality files of a standard graphics program. Revised versions should be returned within 3 months of the first date of decision. Failure to do so will result in any resubmission being treated as a new version and will therefore carry a new date of receipt.

## Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.



## Preparation

### NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

## References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

## Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

#### ***Figures and tables embedded in text***

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### ***Use of word processing software***

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with

Elsevier:<http://www.elsevier.com/guidepublication>). 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.

#### **Manuscript Format**

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible submissions will be returned to authors for revision. All pages must be numbered, including the Title Page, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, and the names and address of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated). Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Please do not add line numbering to your source file as this will be added automatically by the EES system upon building of the PDF.

#### **Introduction**

Introduction: A concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

#### **Material and methods**

Materials and Methods: A detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well-established methods and techniques may be identified by reference only.

#### **Results**

Results: Presented concisely with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

#### **Discussion**

Discussion: A succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comments are discouraged.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Each author's academic or professional qualifications should also be listed. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's

name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

Abstract: A self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate 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, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 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.

### **Abbreviations**

Abbreviations should be used sparingly. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Acknowledgements: Providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

### **Nomenclature**

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible, with the aid of CAS Registry and EC numbers.

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## **Artwork**

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

#### *Formats*

Regardless of the application used, 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 the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### ***Color artwork***

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

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

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. 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**

Tables should be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein.

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the

table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **Reference links**

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

### **Reference management software**

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

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

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

*Examples:*

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research.

Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since

video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### AudioSlides

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

### Supplementary data

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

### Submission checklist

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

#### Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

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



### After Acceptance

#### Use of the Digital Object Identifier

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

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

## Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. 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. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

## Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).



## Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

## 7.3 Normas da Revista *Journal of Ethnopharmacology*



### Introduction

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

use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

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

### Classification of your paper

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

### The "rules of 5"

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

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

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

### Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.

Outlines for potential reviews need to include:

- A detailed abstract using the structure provided in the guidelines
  - An annotated table of contents
  - A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
  6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor [j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk](mailto:j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk) with an outline.
  7. Conference announcements and news.



## Before You Begin

### Ethics in publishing

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

## Policy and ethics

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

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

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

### Conflict of interest

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

### Submission declaration and verification

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

### Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

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

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

#### *For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more

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

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

#### *For Open Access articles*

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

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

#### **Role of the funding source**

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

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

##### **Subscription**

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

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

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

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

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

#### Language (usage and [editing services](#))

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

#### Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### Additional information

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

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

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

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

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

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

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



#### Preparation

##### Reference formatting

References in the manuscript should be given with the name of the first author (in case of 2 authors, both names,

and in case of more first author et al.), and the year of publication, in the reference list any style or format can be used as long as the style is consistent. In the list all author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### Use of word processing software

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

#### **Article structure**

##### ***Subdivision - numbered sections***

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

##### ***Introduction***

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

##### ***Material and methods***

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

##### ***Theory/calculation***

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

##### ***Results***

Results should be clear and concise.

##### ***Discussion***

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

##### ***Conclusions***

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

##### ***Glossary***

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

##### ***Appendices***

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

#### **Essential title page information**

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

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

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

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

### Graphical abstract

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

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Keywords

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

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

### Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:  
Chemical compounds studied in this article  
Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem

CID: 15865)

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

### **Plant names**

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with [www.theplantlist.org](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.).

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### **Electronic artwork**

##### *General points*

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

#### *Formats*

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

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

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

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

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

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

**Please do not:**

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

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

**Color artwork**

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

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

**Figure captions**

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

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References**

**Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "*Personal communication*" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

**Reference links**

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

### **Reference management software**

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

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

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

When a web citation with a link is being used as a reference, the link should be checked, and that date reported with the link as "accessed on March 29, 2012":

American Chemical Society. 2012. Ethical guidelines to publication of chemical research. <http://pubs.acs.org/userimages/ContentEditor/1218054468605/ethics.pdf>. Accessed on March 31, 2012.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research.

Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## AudioSlides

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

## Supplementary data

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

## Submission checklist

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

### Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

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



## After Acceptance

### Use of the Digital Object Identifier

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

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

### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral 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 upload all of your corrections within 48 hours. 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).



### Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.