

MYLENA DA SILVA VARGAS

**INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Celtis ehrenbergiana***

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Pampa, campus
Uruguaiana como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Fabiane Moreira Farias

URUGUAIANA/RS

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

V5861 Vargas, Mylena da Silva
Investigação da composição química e da capacidade
antioxidante dos extratos das folhas de *Celtis ehrenbergiana* /
Mylena da Silva Vargas.
68 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2020.

"Orientação: Fabiane Moreira Farias".

1. *Celtis ehrenbergiana*. 2. CLAE-DAD. 3. flavonoides C-
glicosilados. I. Título.

MYLENA DA SILVA VARGAS

**INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Celtis ehrenbergiana***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Pampa,
campus Uruguaiana como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Dissertação defendida e aprovada em: 05/08/2020

Banca examinadora:



Profa. Dra. Fabiane Moreira Farias

Orientadora

Unipampa



Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin

Unipampa



Prof. Dr. Rodrigo José Freddo

Unipampa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pelas bênçãos em minha vida e por sempre guiar meu caminho.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Marilei e Carlos, que são a principal razão pelas minhas conquistas, sempre me incentivando, me cobrando e apoiando. Tudo que faço é pensando em vocês, o que sou devo a criação que vocês me deram. Amo demais!

Aos professores e colegas e ao laboratório 423 e todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação. Obrigada pela parceria, por cada aprendizado!

À Profa Dra Fabiane Moreira Farias que me acolheu no grupo de pesquisa desde o início da Graduação. Obrigada pelos ensinamentos, por todos os anos, pela orientação!

Aos colegas do laboratório 409, obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês. Agradeço à todos os professores da Unipampa – Uruguaiana de toda a graduação e da pós, por cada experiência em aula compartilhada.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade.

Enfim, à todas as pessoas que me acompanharam por esse trajeto e que Deus colocou na minha vida me mostrando o quanto Ele é bom. Muito obrigada!!

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), grande parte da população mundial emprega as plantas medicinais como forma primária de tratamento de saúde. Apesar do avanço da tecnologia, ainda há muitas espécies desconhecidas e sem referencial científico para embasar o uso popular, como é o caso da espécie *Celtis ehrenbergiana*. Muitas espécies do gênero têm uso medicinal por via oral, uso interno, mas a espécie estudada apresenta relatos de utilização via tópica pelos habitantes do município de Uruguaiana - RS. O objetivo do estudo foi buscar informações que possam contribuir para os pacientes que fazem tratamento com o chá das folhas de *C. ehrenbergiana*. O material vegetal foi coletado na cidade no período de novembro de 2017 a novembro de 2018 e uma análise fitoquímica foi previamente realizada. Foram preparados o extrato aquoso liofilizado de *Celtis ehrenbergiana* (EALCe), por decocção com água destilada, e o extrato metanólico bruto (EMBCe), por maceração com metanol. A partir dos extratos prontos, determinou-se as concentrações de polifenóis totais, obtendo conteúdo de $41,73 \pm 1,67$ mg de ácido gálico/g para EALCe e $42,36 \pm 1,92$ mg de ácido gálico/g de EMBCe, foram determinadas $4,64 \pm 1,58$ mg de quercetina/g de EALCe e $6,63 \pm 1,90$ mg de quercetina/g de EMBCe como conteúdo de flavonoides totais e, realizou-se a determinação do conteúdo de taninos totais, onde foi encontrado $1,12 \pm 0,15\%$ no EALCe e $0,92 \pm 0,10\%$ para o EMBCe. No EMBCe analisado por cromatografia a gás (CG/EM) foram identificados nove compostos: vitamina E (28,50%), estigmast-5-en-3-ol oleato (15,57%), ácido 5-hidroxipecólico (14,63%), gamma-sitosterol (13,52%), trans-esqualeno (10,39%), ácido n-hexadecanóico (8,08%), ácido linolênico (3,41%), fitol (3,89%) e ácido palmítico (2,01%), os compostos encontrados tiveram relatos de atividade antioxidante. Os dois extratos foram analisados por CLAE-DAD comparando com substâncias de referência para polifenóis e flavonóides, nenhum dos compostos testados foram detectados em *C. ehrenbergiana*, mas há relatos para o gênero sobre composição de flavonóides C-glicosilados. No teste *in vitro* antibacteriano, *C. ehrenbergiana* apresentou MIC maior que $512 \mu\text{g/mL}$ e maior que $256 \mu\text{g/mL}$ para bactérias Gram-positivas e Gram negativas, respectivamente. O que não caracteriza efeito biológico considerável para uso popular de espécie, pois a quantidade de vegetal deverá ser muito maior do que

a usual na preparação do “chá”. Como resultado na inibição da captura de radicais livres, pelo método de DPPH, o EALCe apresentou maior inibição que o EMBCe.

Palavras-chave: *Celtis ehrenbergiana*, CLAE-DAD, flavonoides C-glicosilados

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), a large part of the world population uses medicinal plants as a primary form of health treatment. Despite the advancement of technology, there are still many unknown species and no scientific reference to support popular use, such as the *Celtis ehrenbergiana* species. Many species of the genus have medicinal use for oral, internal use, but the studied species presents reports of topical use by the inhabitants of the municipality of Urugaiana - RS. The aim of the study was to seek information that can contribute to patients undergoing treatment with *C. ehrenbergiana* leaf tea. The plant material was collected in the city from November 2017 to November 2018 and a phytochemical analysis was previously performed. The lyophilized aqueous extract of *Celtis ehrenbergiana* (LAECe) was prepared by decoction with distilled water and the crude methanolic extract (MECe) by maceration with methanol. From the ready extracts, the concentrations of total polyphenols were determined, obtaining a content of 41.73 ± 1.67 mg of gallic acid / g for LAECe and 42.36 ± 1.92 mg of gallic acid / g of MECe, 4.64 ± 1.58 mg of quercetin / g of LAECe and 6.63 ± 1.90 mg of quercetin / g of MECe were determined as total flavonoid content, and the determination of total tannin content was carried out, where $1.12 \pm 0.15\%$ was found in LAECe and $0.92 \pm 0.10\%$ for MECe. In the MECe analyzed by gas chromatography (GC / MS) nine compounds were identified: vitamin E (28.50%), stigmast-5-en-3-ol oleate (15.57%), 5-hydroxypipericolic acid (14, 63%), gamma-sitosterol (13.52%), trans-squalene (10.39%), n-hexadecanoic acid (8.08%), linolenic acid (3.41%), phytol (3.89%) and palmitic acid (2.01%), the compounds found had reports of antioxidant activity. The two extracts were analyzed by HPLC-DAD comparing with reference substances for polyphenols and flavonoids, none of the tested compounds were detected in *C. ehrenbergiana*, but there are reports for the genus on the composition of C-glycosylated flavonoids. In the in vitro antibacterial test, *C. ehrenbergiana* presented MIC greater than $512 \mu\text{g} / \text{mL}$ and greater than $256 \mu\text{g} / \text{mL}$ for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. What does not characterize a considerable biological effect for popular use of species, as the amount of vegetable should be much greater than usual in the preparation of "tea". As a result of inhibiting the capture of free radicals by the DPPH method, LAECe showed greater inhibition than MECe.

Keywords: *Celtis ehrenbergiana*, HPLC - DAD, glycosylated C flavonoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Biossíntese de metabólitos vegetais.

Figura 2 – Estrutura básica de um composto fenólico.

Figura 3 – Núcleo fundamental de flavonoides e subclasses principais.

Figura 4 – Estruturas de flavonoides C-glicosilados.

Figura 5 – Reações de formações de radicais livres.

Figura 6 – Diferença estrutural entre Orientina e Vitexina.

Figura 7 – Curva de calibração para polifenóis totais.

Figura 8 – Curva de calibração para flavonoides totais.

Figura 9 – Cromatograma de CG-EM do EMBCe.

Figura 10 – Cromatogramas de HPLC referentes aos extratos de *C. ehrenbergiana* e as substâncias de referência.

Figura 11 – Espectros UV dos picos do EMBCe.

Figura 12 – Espectros UV dos picos do EALCe.

Figura 13 – Cromatograma e espectros UV dos picos da FB de *C. ehrenbergiana*.

Figura 14 – Microplaca ensaio DPPH.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classe de compostos fenólicos em plantas.

Tabela 2 – Os flavonoides C-heterosídeos mais comuns.

Tabela 3 – Conteúdo de polifenóis, flavonóide e taninos totais em *C. ehrenbergiana*.

Tabela 4 – Identificação por CG-EM no EMBCe.

Tabela 5 – Compostos fenólicos usados como padrões na análise por CLAE-DAD.

Tabela 6 – Atividade antibacteriana de *C. ehrenbergiana*, avaliada através do teste de microdiluição em caldo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

OH – Grupo hidroxila

H₂O₂ – Radical peróxido de hidrogênio

COOH – Grupo carboxila

H⁺ - Próton

C1, C6 e C8 – Moléculas de Carbonos dos compostos

C-C – Ligação entre duas moléculas de Carbonos

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

O₂^{•-} - Radical ânion superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

GPx – Enzima Glutathione Peroxidase

PRx – Peroxirredoxinas

GSH – Glutathione

TRx – Tiorredoxina

TRxR – Enzima Tiorredoxina Redutase

Ω3 – Ácido Graxo do tipo Ômega 3

APG II – *Angiosperm Phylogeny Group* (Grupo para a Filogenia das Angiospermas)
_ sistema de classificação

RSH – Grupos tiol

HO-1 – Proteína Heme Oxigenase

EALCe – Extrato Aquoso Liofilizado de *Celtis ehrenbergiana*

EMBCe – Extrato Metanólico Bruto de *Celtis ehrenbergiana*

p/v – Concentração de solução em peso/ volume

nm – Nanômetro

CG-EM – Técnica de Cromatografia a Gás acoplada a um Espectrômetro de Massa

mL/min – Mililitros/ minuto

μL – Microlitros

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector de diárranjo de diodos

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CIM - Concentração Inibitória Mínima

S. Coagulase negativo – Bactéria *Staphilococcus* coagulase negativo

DPPH – *radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS	17
3.2 METABÓLITOS VEGETAIS.....	18
3.2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	18
3.2.1.1 FLAVONOIDES C-GLICOSILADOS.....	20
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
3.4 GÊNERO <i>CELTIS</i>	24
3.4.1 ESPÉCIES CONHECIDAS.....	25
Investigação da Composição Química e da Capacidade Antioxidante dos extratos das folhas de <i>Celtis ehrenbergiana</i>	28
Resumo.....	28
Abstract	29
Introdução	29
Materiais e Métodos	31
Resultados e Discussão	35
Conclusão	47
DISCUSSÃO GERAL.....	49
CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO A – Normas da Revista The Scientific World Journal	61

1 INTRODUÇÃO

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, despertando o interesse dos pesquisadores no sentido da descoberta de novas entidades químicas com diferentes atividades farmacológicas ou de substâncias que possam atuar como protótipos para novos fármacos (ROZATTO, 2012). No Brasil, a grande biodiversidade vegetal representa um caminho promissor para a descoberta de novos medicamentos destinados ao tratamento de patologias que ainda hoje necessitam de inovações (FIRMO *et al.*, 2014). Paralelamente ao potencial no campo científico, o conhecimento empírico da medicina popular sobre as propriedades terapêuticas de plantas vem sendo acumulado por várias comunidades e grupos étnicos durante séculos (FIRMO *et al.*, 2014), sendo que as espécies vegetais ainda hoje são amplamente empregadas tradicionalmente como tratamento alternativo e/ou complementar de diferentes doenças, por serem consideradas uma terapia de fácil acesso e de menor custo (GROCHANKE *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), grande parte da população mundial emprega as plantas medicinais como forma primária de tratamento de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), motivadas por fatores que vão além do custo e facilidade de acesso.

A tendência no uso de plantas medicinais ocorre devido à crença das pessoas na inocuidade das espécies vegetais e de fitoterápicos, pois se acredita que, por serem de origem natural, são seguras e saudáveis. Esta ideia é errônea, uma vez que existe uma variedade de plantas que, muitas vezes, diferem em nomes conhecidos popularmente, levando a erros de identificação pelos usuários, além de apresentarem misturas complexas de diversos constituintes químicos, dos quais se conhece pouco sobre a toxicidade (ALEXANDRE *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2010). Ao contrário da crença popular, o que é natural pode promover efeitos adversos, toxicidade, além de interações medicamentosas significativas, pois a distinção entre efeito medicamentoso e efeito tóxico se faz com relação à dose e a via de administração (FRANÇA *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008). Contudo, as pesquisas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais e existem lacunas quanto a informações técnicas de compostos bioativos, de modo a garantir

qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas, daí a importância e necessidade da monitorização e farmacovigilância de fitoterápicos e plantas medicinais (SILVEIRA *et al.*, 2008; FIRMO *et al.*, 2011).

Um exemplo dentre as espécies, é a *Celtis ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm., reconhecida popularmente como Taleira, para uso tópico de afecções de pele, onde os usuários seguem apenas o conhecimento empírico. O gênero *Celtis* pertence à família CANNABACEAE (ULMACEAE) e compreende 70 espécies de arbustos ou árvores, amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas (HWANG *et al.*, 2003; SORRENTI *et al.*, 2016). O emprego da Taleira na forma da decocção de suas folhas para o tratamento de acne, micoses de unhas e como cicatrizante de dermatofitoses não tem embasamento científico, surgindo a necessidade da verificação de sua constituição química e avaliação farmacológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a investigação fitoquímica e avaliar possível atividade antibacteriana e antioxidante das folhas de *Celtis ehrenbergiana*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o doseamento de conteúdo total de polifenóis, flavonóides e taninos nos extratos das folhas de *Celtis ehrenbergiana*.
- Avaliar a composição do extrato metanólico das folhas de *C. ehrenbergiana* por Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- Analisar a composição do extrato aquoso das folhas de *C. ehrenbergiana* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- Avaliar a possível atividade antimicrobiana dos diferentes extratos das folhas de *Celtis ehrenbergiana*.
- Avaliar o efeito antioxidante dos extratos das folhas de *C. ehrenbergiana*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

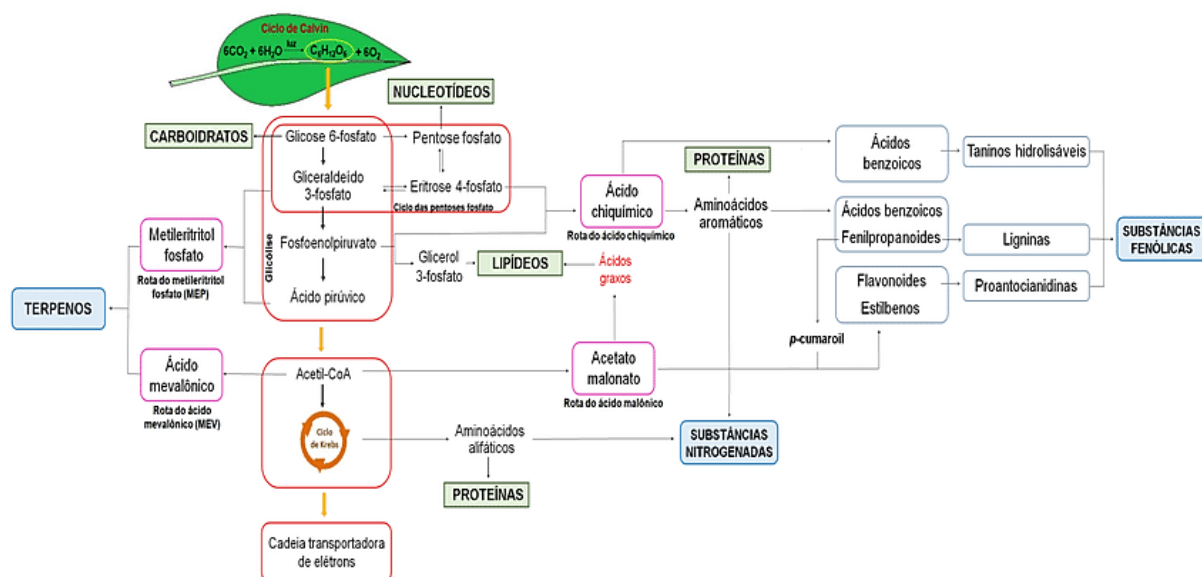
Estima-se que o uso das plantas acompanha a existência do homem, na medida que estas serviram como ferramenta para diferentes finalidades, como alimentação ou no tratamento de doenças e ferimentos. Desde então, os conhecimentos empíricos sobre as plantas são passados de avós para seus netos, tornando-se uma questão cultural (NOBREGA *et al.*, 2017). De acordo com registros antigos, as plantas nativas de um continente foram difundidas para outros pelos seus colonizadores a partir do conhecimento de seus potenciais. No Brasil, os primeiros relatos mostram que algumas espécies conhecidas começaram a ser agregadas aos remédios trazidos da Europa, mas isso só foi reconhecido mais tarde, com novas descobertas de diversas plantas medicinais (BRANDÃO, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), grande parte da população mundial emprega as plantas medicinais como forma primária de tratamento de saúde, motivadas por fatores que vão além do custo e facilidade de acesso (ALENCAR *et al.*, 2019). Através de uma consulta pública, a Anvisa reuniu informações sobre o uso terapêutico de plantas medicinais trazendo um conjunto de monografias sendo útil para os usuários e para os profissionais de saúde orientando a prescrição aos pacientes. No compêndio, o maior número de citações está para tratamento de problemas gástricos: espécies *Cynara scolymus*, *Maytenus ilicifolia*, *Peumus boldus*, *Psidium guajava* e *Senna alexandrina*. Encontra-se também espécies com indicações terapêuticas ansiolíticas e sedativas: *Hypericum perforatum*, *Matricaria chamomilla*, *Passiflora incarnata* e *Valeriana officinalis*. E plantas bastante utilizadas como cicatrizantes tópicos, anti-inflamatórios e antissépticos: *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Lippia sidoides* e *Stryphnodendron adstringens* (ANVISA, 2016). Por serem de origem natural, as pessoas acreditam que as espécies vegetais são seguras e saudáveis, porém, há uma diversidade muito grande e muitas vezes diferem em nomes populares, levando a erros de identificação pelos usuários. Além de apresentarem misturas complexas de diversos constituintes químicos, dos quais se conhece pouco sobre a toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

3.2 METABÓLITOS VEGETAIS

As plantas, como todo organismo vivo, sofrem reações biossintéticas, que resultam no seu metabolismo celular. Através desses processos químicos ocorre a produção de compostos que podem ser essenciais ou não para a existência dos vegetais (figura 1). Os processos que dão origem as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento de um indivíduo, caracterizam o metabolismo basal (metabolismo primário). Os metabólitos basais sintetizados são: lipídeos, aminoácidos e proteínas, carboidratos (KREIS *et al.*, 2017). Enquanto o intitulado metabolismo especial (metabolismo secundário) inclui a totalidade dos processos de inter-relações do indivíduo com seu meio ambiente, resultando em compostos dispensáveis para seu desenvolvimento. Muitos deles são os responsáveis por causar efeitos em outras espécies de seres vivos, tanto farmacológicos quanto tóxicos. Os metabólitos especiais são produzidos a partir dos basais, dentre eles: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (HIDALGO *et al.*, 2016).

Figura 1. Biossíntese de metabólitos vegetais (Raymundo *et al*, VII Botânica no Inverno, 2017)

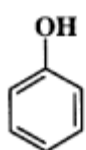


3.2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são uma grande classe de produtos do metabolismo especial e podem ser encontrados por toda a planta, desde partes aéreas, flores, folhas, sementes, frutos, caules e raízes. A estrutura desses compostos contém pelo

menos um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático (figura 2). Muitos deles apresentam propriedades biológicas, farmacológicas, entre outras, que podem ser influenciadas pela posição e número de grupos fenólicos (HAN *et al.*, 2018) (tabela 1 (ANGELO & JORGE, 2007)).

Figura 2. Estrutura básica de um composto fenólico (IMAMURA & BAPTISTELLA, 2000).



Fenol

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_2)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_2)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

As atividades mais reconhecidas são: a ação como quelantes de metais, antioxidantes, agentes redutores ou decompositores de oxigênio e H₂O₂, com a inibição ou retardo na etapa de iniciação ou interrompendo a propagação da peroxidação lipídica, diminuindo a formação dos produtos da decomposição (TOHMA *et al.*, 2017). Agem como antioxidantes diretos, primários ou anti-radicais, transferindo átomos de hidrogênio e/ou elétrons (MENDILI *et al.*, 2019).

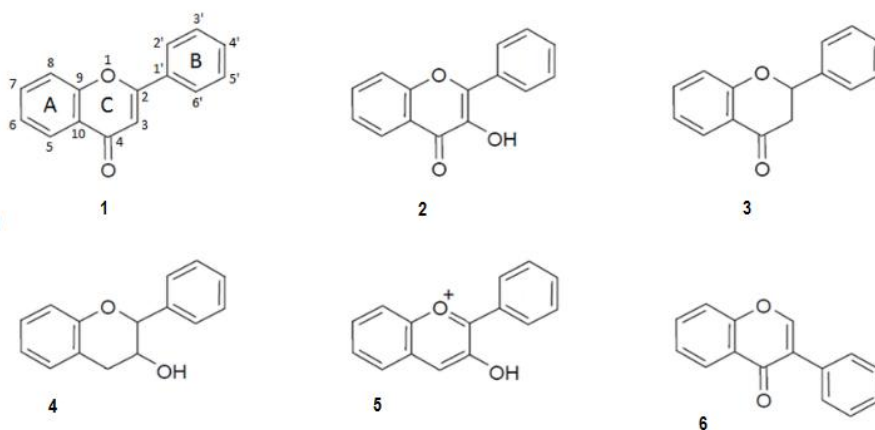
Os compostos fenólicos podem interromper as reações de oxidação em cadeia pela capacidade de doar átomos de hidrogênio ou quelar íons metálicos. Conforme já citado, as posições dos grupos influenciam na atividade dos compostos, os grupos hidroxila em posição meta do grupo carboxila (-COOH) podem apresentar maior atividade antioxidante do que nas posições *orto* ou *para*, devido aos elétrons do grupo carboxila interferir na capacidade de doar H⁺ dos grupos hidroxila. Assim como, grupos com mais doadores de elétrons têm maior poder antioxidante (KOKSAL *et al.*, 2017).

Devido aos impactos indesejados que antioxidantes sintéticos causam, o interesse pelos efeitos antioxidantes dos constituintes de fontes naturais cresceu, da mesma forma que as informações sobre a utilização de produtos naturais, levando a um aumento da pesquisa da composição e sua relação com o poder antioxidante

destes produtos (HAN *et al.*, 2018). Extratos vegetais vêm sendo estudados, a partir de suas informações populares, e um deles é o extrato de *Mentha longifolia*, rico em compostos fenólicos, popularmente, a espécie é usada para distúrbios gastrointestinais. De acordo com Patonay e colaboradores (2019), foram identificados flavonoides e sua extração aquosa, obteve melhor resultado para polifenóis antioxidantes que o extrato metanólico.

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Encontram-se sob diversas formas estruturais, contendo um núcleo fundamental. Podem estar conjugados com moléculas de açúcar, os heterosídeos, ou na forma livre, sem o açúcar, chamado de aglicona ou genina. Os principais são as flavonas, os flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonoides e antocianinas (figura 3) (ZUANAZZI *et al.*, 2017). Nos vegetais, estes compostos desempenham função de proteger contra raios ultravioleta, insetos e microorganismos. Muitos desses compostos possuem também importantes propriedades farmacológicas, como antioxidante, antiviral, antiinflamatória, antimicrobiana, entre outros estudos (SANTOS & RODRIGUES, 2017).

Figura 3. Núcleo fundamental de flavonoides e subclasses principais: Flavonas (1), Flavonóis (2), Flavanonas (3), Flavanóis (4), Antocianinas (5) e Isoflavonoides (6) (ZUANAZZI *et al.*, 2017).

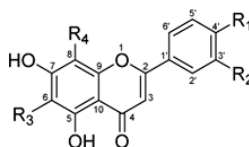


3.2.1.1 FLAVONOIDES C-GLICOSILADOS

Os flavonoides C-glicosilados possuem ligação entre o carbono anomérico da fração glicosil (C1) e um ou dois carbonos do Anel A do flavonoide (sempre C6 ou C8) (figura 4), o que possibilita a diferenciação com os flavonoides O-heterosídeos e

sendo a ligação C-C resistente a hidrólise ácida, resultando numa maior estabilidade em comparação dos compostos (ZUANAZZI *et al.*, 2017).

Figura 4. Estruturas de flavonoides C-glicosilados



Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1) Shafosídeo	OH	H	glucose	arabinose
(2) Isohafosídeo	OH	H	arabinose	glucose
(3) Isoorientina	OH	OH	glucose	H
(4) Orientina	OH	OH	H	glucose
(5) Isovitexina	OH	H	glucose	H
(6) Luteolina 6-C-quinovosídeo	OH	OH	quinose	H
(7) Luteolina 6-C-fucosídeo	OH	OH	fucose	H

Tabela 2. Os flavonoides C-heterosídeos mais comuns (SIMÕES *et al.*, 2017)

Nome trivial	Substituintes
lucenina-2	6,8-di-C-gli-luteolina
Orientina	8-C-gli-luteolina
Chafosídeo	6-C-gli-8-C-ara-apigenina
Escoparina	8-C-gli-crisoeriol
vicenina-1	6-C-xil-8-C-gli-apigenina
vicenina-2	6,8-di-C-gli-apigenina
vicenina-3	6-C-gli-8-C-xil-apigenina
Violantina	6-C-gli-8-C-rha-apigenina
Vitexina	8-C-gli-apigenina

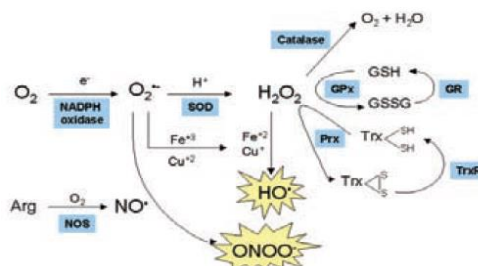
Uma espécie muito conhecida por sua composição é a *Passiflora incarnata* que contém principalmente C-glicosilflavonas derivados de apigenina e luteolina. Rehwald e colaboradores (1994) investigaram qualitativamente os flavonóides em *P. incarnata*, relataram vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina e saponarina como componentes principais. Descrita pela primeira vez, a presença de flavonoides C-glicosídeos na espécie *Urtica membranacea*, no estudo de Carvalho e colaboradores (2017) que relacionou com outras espécies do gênero apresentando alto teor de flavonas luteolina e apigenina C-glicosídeos. *Artocarpus heterophyllus* pertence à família Moraceae e tem relatos de efeitos farmacológicos, através de sua casca e folhas. Wen e colaboradores (2017) identificaram pela primeira vez 2"-O-β-D-xilosilvitexina na espécie e constataram que a aglicona apigenina apresenta atividade pró-oxidante em alta concentração mas na forma C-glicosilada melhora efeito antioxidante eliminado efeito de pró-oxidação.

Dois novos compostos de C-glicosil flavona e favonol foram isolados de *Achillea cretica*. Hichri e colaboradores (2018) caracterizaram e investigaram sua atividade antioxidante, observando grande efeito no extrato butanólico do vegetal podendo relacionar a presença desses isolados no mesmo. Em estudo por Gong *et al.*, (2015) realizou-se a detecção de compostos e avaliação da capacidade antioxidante de diferentes extratos de bambu (*Phyllostachys nigra*: as extrações aquosa e butanólica das folhas apresentaram maior atividade antioxidante comparados com o extrato de aparas de bambu, pois aqueles apresentam compostos flavonoides C-glicosídeos (orientina, homoorientina, vitexina e isovitexina), enquanto o último é formado por ácidos fenólicos comuns.

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Durante o metabolismo aeróbico normal, são gerados radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GONG *et al.*, 2015). Esses produtos são chamados pró- oxidantes ou oxidantes que são eliminados por mecanismos de proteção quando em condições normais, mas em condições fisiopatológicas, podem ser produzidos em altas quantidades o que pode levar a mutações prejudicando o organismo. As enzimas catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (Prx), eliminam o H_2O_2 . A catalase converte em água e oxigênio. A GPx remove H_2O_2 no processo de oxidação de glutathiona (GSH). Já a Prx utiliza a proteína tiorredoxina (Trx) como substrato enquanto tiorredoxina redutase (TrxR), converte a tiorredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida (figura 5) (BARBOSA *et al.*, 2006). O interesse e a pesquisa de novos compostos naturais benéficos à saúde vêm aumentando e assim, a indústria farmacêutica e de alimentos, busca seus ativos em vegetais (AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016).

Figura 5. Reações de formações de radicais livres (BARBOSA *et al.*,2006)

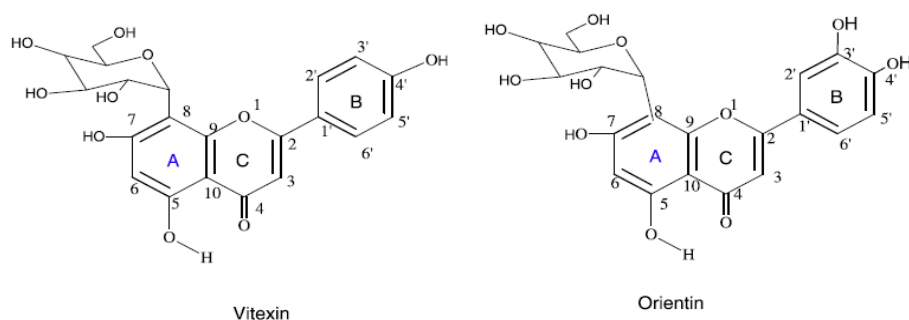


O gengibre (*Zingiber officinale*) é popularmente utilizado no tratamento de dores de cabeça e náuseas, febre e resfriados, artrite e distúrbios reumáticos e desconforto muscular. Já foi citado que o gengibre apresenta efeitos anti-inflamatórios, anticâncer, hepatoprotetores e renoprotetores e antioxidantes. Com base nisso, Tohma e colaboradores (2017) realizaram a quantificação e identificação de alguns compostos e a comparação dos extratos aquoso e etanólico do gengibre com antioxidantes sintéticos. Os extratos de gengibre apresentaram na sua composição ácidos fenólicos, o ácido pirogálico p-hidroxibenzoico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico. O gengibre mostrou-se comparável aos antioxidantes sintéticos com poder redutor de metal e de eliminação de radicais e melhor atividade quelante. *Linum usitatissimum* (conhecida popularmente como linhaça) é cultivada para uso em alimentos funcionais devido as fibras e sua composição como óleos de tocoferóis, ácido graxo $\Omega 3$, proteína e antioxidantes. Caracterizou-se a presença de alguns fenólicos como a vanilina, ácido p-cumárico, ascórbico, p-hidroxibenzoico, ferúlico e elágico nos extratos aquoso e etanólico da espécie. Habilidades redutora, de eliminação de radicais também foram identificadas por Han *et al.*, (2018).

Derakhsan e colaboradores, (2018) analisaram cascas, suco e sementes de romã (*Punica granatum*) referente aos níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O extrato da casca não só apresentou maior quantidade de compostos fenólicos do que sementes e o suco, como também uma alta capacidade antioxidante e esse resultado leva a um melhor entendimento do porquê desta planta ser utilizada há tanto tempo na fitoterapia iraniana. As folhas de *Thymus vulgaris* (tomilho turco) são usadas na medicina popular para tratamento da tosse, bronquite e como uso tópico para tratamento de pele. Ácido gálico, pirogálico e ferúlico são os mais abundantes nos extratos da espécie e sua boa capacidade antioxidante e eliminação de radicais pode ser devido às concentrações destes compostos fenólicos (KOKSAL *et al.*, 2017). Saha e Verma (2016) encontraram no extrato dos frutos de *Terminalia chebula*, popularmente conhecida como haritaki, a presença de fitoquímicos como: ácido gálico, elágico, tânico, ácido chebulico, ácido chebulágico, entre outros. Relatos para a espécie apontam atividades citoprotetoras, antidiabéticas, antibacterianas e antiinflamatórias. Os compostos polifenóis encontrados se correlacionam com a capacidade de *T. chebula* agir em radicais livres.

Descrito por Lee e colaboradores (2016) espécies de *Fagopyrum esculentum* (trigo sarraceno comum) e *Fagopyrum tataricum* (trigo sarraceno tartário) apresentam alto poder antioxidante, podendo ser atribuído aos seus níveis elevados de flavonóides, entre eles: rutina, quercetina e flavonóides C-glicosídeos (orientina, vitexina e isovitexina), verificou-se que o conteúdo de rutina, orientina e galato de epicatequina influenciou a atividade antioxidante total do trigo sarraceno. Praveena e colaboradores (2014) avaliaram a fração de acetato de etila das folhas de *Rhynchosia capitata* contendo uma mistura de C-glicosídeos (vitexina, isovitexina, orientina, isorientina e vicenina-2, atuando como uma boa fonte antioxidante. Na pesquisa desses autores, a orientina proporcionou maior propriedade de eliminação de radicais em comparação com a vitexina, correlacionada com a presença de 3'-OH que permite maior estabilidade a molécula e capacidade de doar elétrons em vez de capturá-los (figura 6).

Figura 6. Diferença estrutural entre Orientina e Vitexina (Praveena *et al.*, 2014).



3.4 GÊNERO *CELTIS*

O gênero *Celtis* pertence à família CANNABACEAE (ULMACEAE) e compreende 70 espécies de arbustos ou árvores, amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas (HWANG *et al.*, 2003; SORRENTI *et al.*, 2016). Inicialmente foi colocado na família Ulmaceae e mais tarde foi reclassificado na família Cannabaceae, após novos dados morfológicos, citológicos, químicos e moleculares, que de acordo com APG II (2003), são duas famílias distintas (TORRES & LUCA, 2005). Wiegref *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2002; Sytsma *et al.*, 2002 e, Sattarian 2006 contribuíram para a delimitação da circunscrição de *Celtis* na família *Cannabaceae*, tradicionalmente reconhecido como membro de *Ulmaceae*

subfamília *Celtidoideae* (Engler 1907, Cronquist 1981) (MARTINS & PIRANI, 2009). *Ulmus* e gêneros relacionados contêm derivados hidrolisáveis de canferol, quercetina e miricetina. Por outro lado, *Celtis* e seus familiares são caracterizados por glicoflavonas não hidrolisáveis (SPITALER *et al.*, 2009; OTA *et al.*, 2017).

3.4.1 ESPÉCIES CONHECIDAS

Estudos realizados com algumas espécies do gênero *Celtis*, trazem informações sobre o uso popular, composição química e atividade. Acquaviva e colaboradores (2016) estudaram a espécie *Celtis aetnensis*, um arbusto espinhoso presente no Monte Etna (Sicília). Os resultados revelaram que o extrato de *C. aetnensis* reduziu a viabilidade celular das células de carcinoma de cólon, induzindo apoptose na concentração mais baixa e necrose em dosagens mais elevadas. Além disso, este extrato provocou um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma diminuição nos níveis de grupos tiol (RSH) e na expressão de proteína de heme oxigenase-1 (HO-1).

Celtis africana é comum na África do Sul, onde as folhas são usadas na medicina popular humana e veterinária para o tratamento de indigestão e edema. A casca e as raízes são utilizadas via oral para o tratamento do câncer. Um estudo isolou C-glicosilflavonoides da fração de n-butanol de *C. africana* (AL-TAWEEL *et al.*, 2012). AL-TAWEEL e colaboradores (2012) realizaram estudo de isolamento direcionado sobre a fração em clorofórmio de *C. africana*. Como resultado, nove compostos foram isolados pela primeira vez na espécie, nomeadamente trans-N-Oumaroiltiramina, trans-N-feruloiltiramina, trans-N-cafeoiltilamina, ácido láurico, ácido oleico, ácido palmítico, lupeol, beta-sitosterol e ácido oleanólico, respectivamente. Estes compostos apresentaram potencial anti-inflamatório e antioxidante e atividade moderada de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Celtis australis é uma árvore de até 25 m de altura. Na Europa, a espécie é restrita ao sul. Cresce no norte da África, e no sudeste asiático. As folhas de *Celtis australis* contêm flavonoides raros c-glicosídeos, como acacetina 7-O-glucosídeo, isovitexina, e citiósido, isolados da fração butanólica de um extrato metanólico (SPITALER *et al.*, 2009; SOMMAVILLA *et al.*, 2012). O fruto tem um elevado teor de açúcar e são considerados muito eficazes medicinalmente, devido às suas

propriedades lenitivas e estomacais. As preparações de folhas e frutos têm usos populares como no tratamento da amenorreia, cólicas, diarreia, disenteria, úlceras pépticas e sangramento menstrual. Na medicina popular indiana, a planta é usada para tratamento de fratura do osso, contusões, entorses e dores nas articulações (EL-ALFY *et al.*, 2011). OTA e colaboradores 2017 demonstraram que os extratos de água e álcool das folhas e frutos de hackberry contêm epicatequina, ácido gálico, ácido vanílico, 3,4-dihidroxibenzaldeído, delphinidin-3,5-di-O-glicosídeo, cianidino-3,5-di-O-Glicosídeo e pelargonidin-3,5-di-O-glicosídeo. Esses compostos mostraram algumas atividades antimicrobianas e antifúngicas.

EL-ALFY e colaboradores (2011) estudaram as folhas de *Celtis australis* e *Celtis occidentalis*. Os resultados obtidos para as frações de n-butanol e os principais flavonoides isolados, 2-galactosilvitexina, indicaram que os glicosídeos C-flavonóides em ambas as plantas estudadas são responsáveis pela atividade antioxidante. *Celtis occidentalis*, é uma árvore de tamanho médio nativa da América do Norte. Nativos americanos usam decocções preparadas a partir da casca como auxiliar na menstruação e para aliviar a dor de garganta e no tratamento da icterícia (EL-ALFY *et al.*, 2011).

Na Coreia, *Celtis choseniana* é utilizada como tratamento de doenças relacionadas a inflamação e Kim e colaboradores (2018) encontraram quercetina, luteolina e canferol no extrato metanólico da espécie e identificaram atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*. Bedolla e colaboradores (2018) citam que *Celtis palida* é empregada empiricamente como terapia para inflamação, feridas, tosse, dor de estômago, cólera, dor e infecções de pele. Os autores isolaram o ácido ursólico como componente majoritário e demonstraram que a espécie apresenta baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*. *Celtis philippinensis* é uma árvore lenhosa amplamente distribuída por toda a África tropical, Ásia e Austrália. Dois ésteres triterpênicos (3b-trans-sinapoiloxil-20-en-28-ol e 3b-trans-féruloiloxi-16b-hidroxil-20-ene) foram isolados como constituintes citotóxicos do extrato em clorofórmio dos galhos de *Celtis philippinensis*, juntamente com cinco triterpenos conhecidos, 3b-O-(E)-feruloylbetulina, 3b-O-(E)-coumaroilbetulina, betulina, ácido 20-epibrilónico e ácido ursólico (HWANG *et al.*, 2003).

Celtis iguanaea é uma espécie de porte arbustivo, comumente conhecida por esporão-de-galo, que possui ampla distribuição geográfica ocorrendo desde os Estados Unidos até a América do Sul. O uso popular das folhas de *C. iguanaea* é para o tratamento de vários sintomas e patologias tais como, dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má-digestão e como diurética (PAULA *et al.*, 2010; TREVISAN *et al.*, 2012). Em análise fitoquímica realizada por PAULA e colaboradores (2010), com as folhas de *C. iguanaea* mostraram a presença de flavonoides, cumarinas e mucilagens. SOUZA e colaboradores (2012) obtiveram efeito gastroprotetivo da fração hexânica a partir do extrato etanólico de folhas de *Celtis iguanaea*. Para MARTINS *et al.* (2014), o tratamento com o extrato hexânico reduziu o índice de lesões na úlcera induzida por indometacina e ligadura pilórica, também reduziu o volume de secreção, a acidez total, e aumentou o pH gástrico. Zancher e colaboradores (2018) verificaram que extrato hidroalcoólico de *C. iguanaea* se mostrou eficaz na prevenção da hipercolesterolemia e na proteção contra aterosclerose e hiperglicemia e que tais atividades podem se relacionar aos efeitos antioxidante, inibição enzimática e potencial mimético da insulina.

A espécie *Celtis ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm., popularmente conhecida como taleira ou tala, ocorre nos Estados Unidos, México, Haiti, Porto Rico até Argentina. No Brasil é citada para o Ceará, Paraíba, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (TORRES & LUCA, 2005). Moradores do município de Uruguaiana – RS utilizam a decoção de suas folhas para o tratamento de afecções de pele, como cicatrizante de dermatofitose e acne e para tratar micoses de unhas. De acordo com Martínez & Luján (2011), em Sierras de Córdoba (Argentina), as cascas incineradas dessa planta são utilizadas na medicina veterinária, em carvões acesos com enxofre na forma de banho de fumaça ou inalação, como tratamento da cinomose. Na literatura somente trabalhos de caráter agrônomo sobre a árvore e vegetação estão disponíveis (DACY & FULBRIGHT, 2009; FULBRIGHT *et al.*, 2011; SALEM, 2012; CASTRO *et al.*, 2014; ADHICARI & BRANCO, 2014; MARTÍNEZ, 2015; GANN *et al.*, 2016), não apresentando estudos que indiquem a composição, toxicidade ou que investiguem as atividades farmacológicas. Em função disso, despertou o interesse na busca de dados científicos que justifiquem o uso popular da espécie.

Investigação da Composição Química e da Capacidade Antioxidante dos extratos das folhas de *Celtis ehrenbergiana*

Artigo a ser submetido

Resumo

Em Uruguaiana-RS, Brasil, os moradores utilizam a decocção das folhas de *Celtis ehrenbergiana* no tratamento tópico de afecções de pele, acne e micoses de unhas. O objetivo do estudo foi buscar informações que possam contribuir para dados científicos sobre a composição da espécie. As folhas foram secas e trituradas para preparação do extrato aquoso liofilizado de *Celtis ehrenbergiana* (EALCe) e do extrato metanólico bruto (EMBCe), foram determinadas concentrações de polifenóis totais em mg de ácido gálico /g de extrato, obtendo conteúdo de $41,73 \pm 1,67$ e $42,36 \pm 1,92$, respectivamente. O conteúdo de flavonoides totais resultou: $4,64 \pm 1,58$ mg de quercetina/g (EALCe) e $6,63 \pm 1,90$ mg de quercetina/g (EMBCe) e para a determinação do teor de taninos totais, foi encontrado $1,12 \pm 0,15\%$ e $0,92 \pm 0,10\%$, respectivamente. Nove compostos foram identificados no EMBCe por CG/EM: vitamina E (28,50%), stigmast-5-en-3-ol (15,57%), ácido 5-hidroxipecólico (14,63%), gamma-sitosterol (13,52%), trans-esqualeno (10,39%), ácido n-hexadecanóico (8,08%), ácido linolênico (3,41%), fitol (3,89%) e ácido palmítico (2,01%). Ambos os extratos foram analisados por CLAE-DAD comparando com substâncias de referência para polifenóis e flavonóides, nenhum dos compostos testados foram detectados em *C. Ehrenbergiana*. No teste *in vitro* antibacteriano, *C. ehrenbergiana* não apresentou MIC que caracterize efeito biológico considerável para uso popular de espécie, pois a quantidade de vegetal para obter concentração de inibição deverá ser muito maior do que a usual na preparação do “chá”. Em análise por CLAE-DAD, encontrou-se perfis espectrais característicos de flavonoides C-glicosilados, sendo possível sugerir a presença desses compostos na espécie. Na análise com DPPH, o EALCe apresentou maior inibição que o EMBCe, que pode ser dependente da composição, assim como foi identificado em outras espécies de *Celtis*, sendo o marco inicial para outros estudos que justifiquem o uso da espécie.

Palavras-chave: *Celtis ehrenbergiana*, CLAE-DAD, flavonoides C-glicosilados

Abstract

In Uruguaiana-RS, Brazil, residents use the decoction of *Celtis ehrenbergiana* leaves in the topical treatment of skin disorders, acne and nail fungus. The aim of the study was to seek information that can contribute to scientific data on the composition of the species. The leaves were dried and crushed to prepare the lyophilized aqueous extract of *Celtis ehrenbergiana* (LAECe) and the crude methanolic extract (MECe), concentrations of total polyphenols in mg of gallic acid / g of extract were determined, obtaining contents of 41.73 ± 1.67 and 42.36 ± 1.92 , respectively. The content of total flavonoids resulted: 4.64 ± 1.58 mg of quercetin / g (LAECe) and 6.63 ± 1.90 mg of quercetin / g (MECe) and for the determination of the total tannin content, $1.12 \pm 0.15\%$ and $0.92 \pm 0.10\%$, respectively, were found. Nine compounds were identified in the MECe by GC / MS: vitamin E (28.50%), stigmast-5-en-3-ol (15.57%), 5-hydroxypiperic acid (14.63%), gamma-sitosterol (13.52%), trans-squalene (10.39%), n-hexadecanoic acid (8.08%), linolenic acid (3.41%), phytol (3.89%) and palmitic acid (2.01%). Both extracts were analyzed by HPLC-DAD comparing with reference substances for polyphenols and flavonoids, none of the tested compounds were detected in *C. ehrenbergiana*. In the in vitro antibacterial test, *C. ehrenbergiana* did not present MIC that characterizes considerable biological effect for popular use of species, since the amount of vegetable to obtain inhibition concentration must be much higher than usual in the preparation of "tea". In analysis by HPLC-DAD, spectral profiles characteristic of C-glycosylated flavonoids were found, being possible to suggest the presence of these compounds in the species. In the analysis with DPPH, LAECe showed greater inhibition than MECe, which may be dependent on the composition, as was identified in other species of *Celtis*, being the starting point for other studies that justify the use of the species.

Keywords: *Celtis ehrenbergiana*, HPLC - DAD, glycosylated C flavonoids.

Introdução

A tendência no uso de plantas medicinais ocorre devido à crença das pessoas na inocuidade das espécies vegetais e de fitoterápicos, pois se acredita que, por serem de origem natural, são seguras e saudáveis. Porém, muitas vezes espécies

diferem em nomes conhecidos popularmente, levando a erros de identificação pelos usuários, além de apresentarem misturas complexas de diversos constituintes químicos, dos quais se conhece pouco sobre a toxicidade (ALEXANDRE *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2010). Ao contrário da crença popular, o que é natural pode promover efeitos adversos, toxicidade, além de interações medicamentosas significativas (FRANÇA *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008). No Brasil, a grande biodiversidade vegetal representa um caminho promissor para a descoberta de novos medicamentos destinados ao tratamento de patologias que ainda hoje necessitam de inovações (FIRMO *et al.*, 2014). Contudo, as pesquisas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais e existem lacunas quanto a informações técnicas de compostos bioativos, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas, daí a importância e necessidade da monitorização e farmacovigilância de fitoterápicos e plantas medicinais (SILVEIRA *et al.*, 2008; FIRMO *et al.*, 2011).

Celtis ehrenbergiana (Klotzsch) Liebm., popularmente conhecida como taleira, ocorre no Rio Grande do Sul e a decoção de suas folhas é utilizada pela população para o tratamento de acne e afecções de pele, micoses de unhas e como cicatrizante de dermatofitoses. Porém, sem embasamento científico, surgindo a necessidade da verificação de sua constituição química e avaliação farmacológica. O gênero *Celtis* pertence à família CANNABACEAE (ULMACEAE) e compreende 70 espécies de arbustos ou árvores, amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas (HWANG *et al.*, 2003; SORRENTI *et al.*, 2016). Inicialmente foi colocado na família Ulmaceae e mais tarde foi reclassificado na família Cannabaceae, *Ulmus* e gêneros relacionados contêm derivados hidrolisáveis de canferol, quercetina e miricetina. Por outro lado, *Celtis* e seus familiares são caracterizados por glicoflavonas não hidrolisáveis (SPITALER *et al.*, 2009; OTA *et al.*, 2017).

Outras espécies de *Celtis* tiveram compostos flavonoides C- glicosilados raros, de seus extratos: *C. australis* e *C. occidentalis* (Kaltenhauser *et al.*, 2010; El-Alfy *et al.*, 2011), *C. africana* (Perveen *et al.*, 2011), ambas apresentaram atividade antioxidante relacionada a presença desses compostos. Assim, o objetivo principal desta pesquisa foi analisar a composição química dos extratos das folhas de *Celtis ehrenbergiana* e comparar com a descrição do gênero.

Materiais e Métodos

O material vegetal foi previamente identificado pelo botânico Renato Zachia, tendo uma amostra autêntica depositada no herbário da Universidade Federal de Santa Maria sob o número SMDB 16.112. As folhas de *Celtis ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm. foram coletadas no município de Uruguaiana – RS, entre os meses de novembro de 2017 a novembro de 2018, secas em estufa (40 °C) e trituradas em um micromoinho de facas modelo IKAA11.

O extrato aquoso foi obtido a partir de 200g de material vegetal submetidos à decocção com água destilada, com agitação periódica, mantendo a temperatura cerca de 100 °C por 30 minutos. O extrato foi filtrado e esse processo repetido até o esgotamento total do material vegetal, acompanhado por cromatografia em camada delgada. O líquido filtrado foi congelado e posteriormente liofilizado, resultando no extrato aquoso liofilizado de *C. ehrenbergiana* (EALCe).

Para a obtenção do extrato metanólico, 200g de material vegetal foram submetidos à maceração com metanol até o esgotamento. Posteriormente o extrato foi concentrado em evaporador rotatório para a remoção do solvente orgânico, formando o EMBCe (extrato metanólico bruto de *C. ehrenbergiana*). A partir do extrato metanólico seco, 5 gramas foram re-suspendidos em metanol e dissolvidos em 100mL de água destilada, obtendo-se uma fração hidroalcoólica que foi submetida ao processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, sendo eles: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. A fração hidroalcoólica foi misturada com 50 mL do solvente em um funil de separação, agitada e particionada. Esse processo foi repetido para cada solvente, resultando nas frações: hexano (FH), fração diclorometano (FDCM), fração acetato de etila (FAE) e fração butanol (FB).

Doseamento de Polifenóis Totais

A determinação de polifenóis totais foi realizada de acordo com o método estabelecido por CHANDRA e MEJIA (2004), com uma concentração de amostra de 100 µg/mL. As soluções iniciais de extrato foram diluídas em água destilada até obterem-se as diferentes concentrações. Foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro, calibrado com água destilada. Para a realização dos cálculos,

uma curva de calibração foi previamente preparada, empregando ácido gálico como substância de referência.

Doseamento de Flavonoides Totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados de acordo com ZHISHEN e colaboradores (1999), com uma concentração inicial de amostra de extrato diluído em metanol, 500 µg/mL. Foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro, calibrado com água destilada. Para a realização dos cálculos, foi preparada previamente uma curva de calibração utilizando rutina como substância de referência.

Doseamento de Taninos Totais

O doseamento de taninos totais seguiu a Farmacopéia Brasileira (2010), com uma modificação, usando como substância de referência, o ácido gálico. Prepararam-se as seguintes soluções amostra para polifenóis totais: com extrato, reagente fosfomolibdotúngstico, água destilada e solução de carbonato de sódio a 29% (p/v); solução amostra para polifenóis não adsorvidos: extrato, adicionado a gelatina, reagente fosfomolibdotúngstico, água destilada e carbonato de sódio a 29% (p/v); solução padrão onde foi utilizado ácido gálico como padrão, adicionados os mesmos reagentes. A absorvância foi determinada em 760 nm após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste das interferências. Para calcular o teor, em porcentagem, de taninos, expressos em ácido gálico, seguiu-se conforme a Farmacopéia Brasileira (2010).

Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos como média \pm desvio padrão, utilizando ANOVA.

Identificação dos compostos por CG-EM

Os compostos presentes no EMBCe foram investigados em cromatógrafo gasoso Shimadzu QP-2010, em interface com um espectrômetro de massa (CG-EM). As

seguintes condições foram utilizadas: hélio (99,999%) gás transportador a um fluxo constante de 0,95 mL / min; 1 µL de volume de injeção; temperatura do injetor 250 ° C; modo de injeção *Splitless*, pressão à 49,6 kPa; proporção da divisão 1,7. A temperatura do forno foi programada a partir de 50 ° C em 5 min, com aumento de 10° C; atingindo 280°C em 30 min. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros obtidos com os componentes contidos na biblioteca existente no programa do equipamento, em uma similaridade acima de 85%.

Quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de alta eficiência coplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Inicialmente 0,5 gramas de EMBCe e de EALCe foram dissolvidos em 10 mL de metanol e mantidos no banho de ultrassom até serem totalmente dissolvidos. Em seguida uma alíquota de 1 mL foi filtrada com filtro de seringa de nylon (0,22 µm), e em seguida analisada em CLAE-DAD. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Young Lin (YL) 9100 (Anyang, Korea) com amostrador automático YL9150, equipados com bombas quaternárias YL9110 conectadas a desgaseificador YL9101, acoplado a um detector de diárranjo de díodos YL9160 (CLAE-DAD) e equipado com uma coluna Inertsil ODS-3 (4,6 × 250 mm). As condições do método cromatográfico são de acordo com os utilizados por TAMBORENA *et al.* (2015). Para identificação dos compostos utilizamos a comparação no tempo de retenção e espectro DAD. A curva de calibração foi construída com 6 pontos entre 1 e 10 mg.L⁻¹ contendo ácido gálico; ácido 3,4-dihidroxibenzóico; ácido clorogênico; rutina; ácido cafeico; ácido siringico; ácido cumárico; ácido ferúlico e quercetina. Para a construção da curva de calibração de cada composto fenólico foi utilizado regressão linear.

Para análise das frações butanólica, a amostra foi preparada assim como os extratos. A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido Waters, com detector de arranjo de diodos Altus A-10, equipado com coluna Hipersil (4,6 x 150 mm), partículas 5 µm. A temperatura ambiente, o método seguiu eluição por gradiente, com fase móvel H₂O : MeOH, fluxo de 0,7 mL/min e tempo de corrida de 45min.

Atividade Antibacteriana

Os ensaios *in vitro* para avaliação da possível atividade antibacteriana de *C. ehrenbergiana* foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito nas recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Os extratos e as frações de *C. ehrenbergiana*, foram testados frente à cepas de *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* (ATCC 35218), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Acinetobacter* e *S. coagulase negativo*.

Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo *Mueller Hinton* de modo a garantir uma concentração de 10^6 UFC/mL, e os extratos foram preparados na concentração de 4096 µg/mL, a partir da qual foram realizadas diluições seriadas, de modo que a maior concentração testada foi de 2048 µg/mL e a menor de 4 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas e os resultados foram interpretados a partir da turbidez dos poços, visualizada a olho nu. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. A fim de garantir a confiabilidade dos resultados, foram utilizados no experimento: controles de crescimento e esterilidade, o primeiro com adição de inóculo bacteriano na placa e o outro somente extrato sem inóculo.

Atividade Antioxidante

Inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

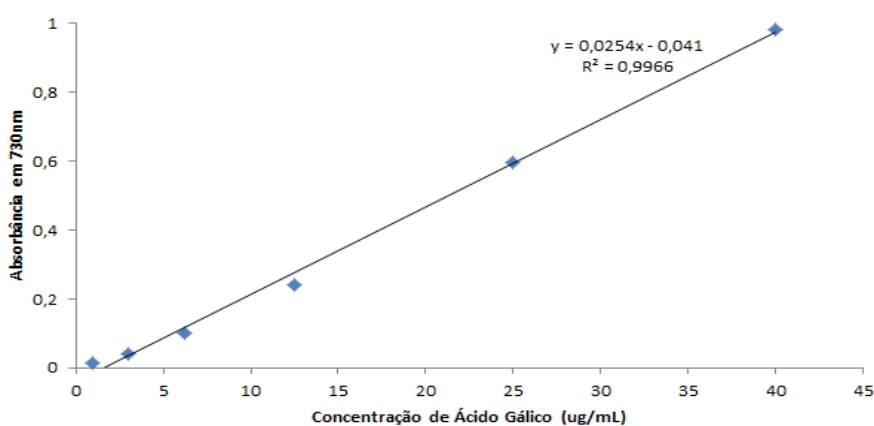
A quantificação do potencial antioxidante pela inibição da captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com Rufino et al. (2007). 15 µL do extrato foi adicionado a 85 µL de água destilada e 50 µL de solução de DPPH 0,3 mM em microplacas de 96 poços. A amostra foi então incubada por 30 minutos privados de luz e a leitura foi realizada em 518 nm em leitor de microplacas (Abs amostra). Como controle foram realizadas leituras somente da amostra (Abs branco) e somente do DPPH (Abs controle DPPH). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (%) obtidos através da fórmula:

$$IP\% = 100 - \{(Abs\ amostra - Abs\ branco) \times 100\} \div Abs\ controle\ DPPH$$

Resultados e Discussão

O fracionamento do EMBCe (15,0%) resultou nas frações FH (12,6%, obtido a partir de 5 gramas do EMBCe), FDCM (3,2%), FAE (1,0%) e FB (5,0%). No EALCe (20,2%) e no EMBCe foram realizados os doseamentos de polifenóis, flavonoides e taninos totais. A análise do conteúdo de polifenóis totais resultou como equação de reta $y = 0,0254x - 0,041$, do padrão de ácido gálico (Figura 7).

Figura 7- Curva de calibração para polifenóis totais

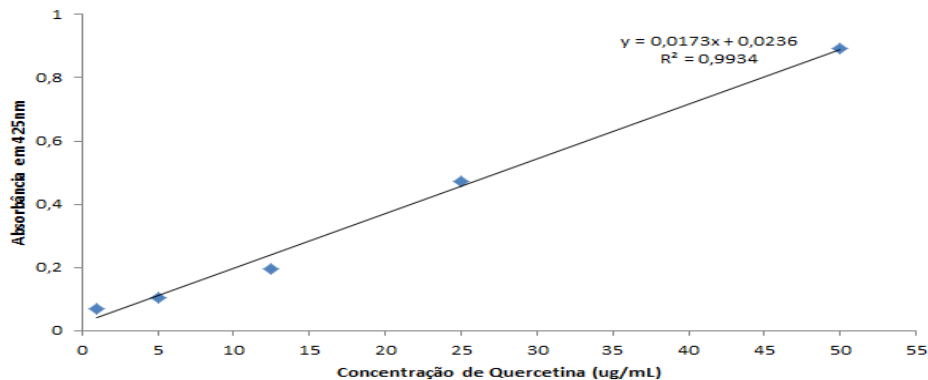


O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico/g de extrato, e determinou-se $41,73 \pm 1,67$ mg de ácido gálico/g de EALCe e $42,36 \pm 1,92$ mg de ácido gálico/g de EMBCe. Através de procedimento semelhante, Ota e colaboradores obtiveram valores de 1,7 mg/g de ácido gálico no extrato aquoso de *C. australis* e 8,9 mg/g de ácido gálico no extrato etanólico, verificaram também uma diminuição no conteúdo destes compostos, ao decorrer da idade das folhas, quando comparadas em duas épocas do ano, folhas mais novas em outubro, apresentaram maior teor do que as coletadas em junho. Os extratos das folhas de *C. ehrenbergiana* foram obtidos de combinação de várias coletas do material vegetal, visto que é uma espécie com composição química desconhecida. Para a espécie *C. africana* há estudo de Adepapo e colaboradores onde expressaram o conteúdo de polifenóis como 14,0 mg/g de ácido tânico para o extrato metanólico de suas folhas. Como mostram os resultados, *C. ehrenbergiana* apresentou maior teor de polifenóis nos extratos das folhas do que outras espécies do gênero.

Os testes para o doseamento de flavonoides totais foram realizados em triplicata e para o cálculo obteve-se a curva padrão de quercetina $y =$

0,0173x+0,0236. Os resultados para este parâmetro estão representados na Figura 8.

Figura 8 - Curva de calibração para flavonoides totais



A concentração de flavonoides foi expressa em mg de quercetina/g de extrato, e foi determinado $4,64 \pm 1,58$ mg de quercetina/g de EALCe e $6,63 \pm 1,90$ mg de quercetina/g de EMBCe. Comparando com o obtido no extrato metanólico das folhas de *C. africana* onde Adepapo e colaboradores encontraram quantidade de 0,70 mg/g de quercetina, o conteúdo também foi maior em EALCe e EMBCe.

Como resultado no doseamento de taninos totais, pelo método da farmacopeia brasileira, a partir de 75mg de amostra, obteve-se $1,12 \pm 0,15\%$ no teor de taninos totais para o extrato aquoso de *C. ehrenbergiana*. Enquanto o EMBCe apresentou $0,92 \pm 0,10\%$ no conteúdo desses compostos. Para o gênero *Celtis*, essa classe de compostos já foi identificada em análise fitoquímica na espécie *C. iguanaea* (Trevisan P., 2010) e *C. integrifolia* (Mahre *et al.*, 2016), porém não foram encontrados dados na literatura para comparação dos teores. Então, o resultado obtido pode, além de contribuir com a literatura, auxiliar para a busca de atividade farmacológica. Os valores, em porcentagem, para os doseamentos realizados nos extratos de *C. ehrenbergiana* estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 3. Conteúdo de polifenóis, flavonóides e taninos totais nos extratos de *C. ehrenbergiana*.

AMOSTRAS	POLIFENÓIS (mg/g \pm DP)	FLAVONÓIDES (mg/g \pm DP)	TANINOS (mg/g \pm DP)
EALCe	41,73 \pm 1,67	4,64 \pm 1,58	11,2 \pm 1,5
EMBCe	42,36 \pm 1,92	6,63 \pm 1,90	9,2 \pm 1,0

Os teores de polifenóis e flavonoides totais encontrados nos extratos de *C. ehrenbergiana* foram mais elevados que os presentes nos extratos das outras

espécies do gênero. Compostos fenólicos presentes em plantas têm atividades comprovadas: antioxidante, anti-inflamatórias, antimicrobianas (BEZERRA *et al.*, 2018; FERRERA *et al.*, 2016; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016). Taninos também apresentam atividades farmacológicas, bactericida, fungicida, cicatrizante, antioxidante, entre outras (MELLO & SANTOS, 2017).

Estas substâncias presentes nas folhas de *Celtis ehrenbergiana* podem contribuir para possíveis efeitos da planta, no seu uso popular como cicatrizante tópico e seus níveis mais elevados nesta espécie podem correlacionar com relatos para uso externo. Para as folhas das espécies de *Celtis*, não foram encontradas referências com esse tipo de utilização. Ahmed e colaboradores (2018) citam relatos da população para uso das cascas de *C. eriocarpa* no tratamento de espinhas, sarna e problemas de pele, mas não trazem informações sobre este material vegetal.

A análise por CG-EM e a comparação dos espectros com a biblioteca do equipamento resultou na identificação de nove compostos presentes no EMBCe, com uma similaridade acima de 85% (figura 9) e a proporção de cada composto encontrado, está citado na tabela 4:

Figura 9. Cromatograma de CG-EM do EMBCe

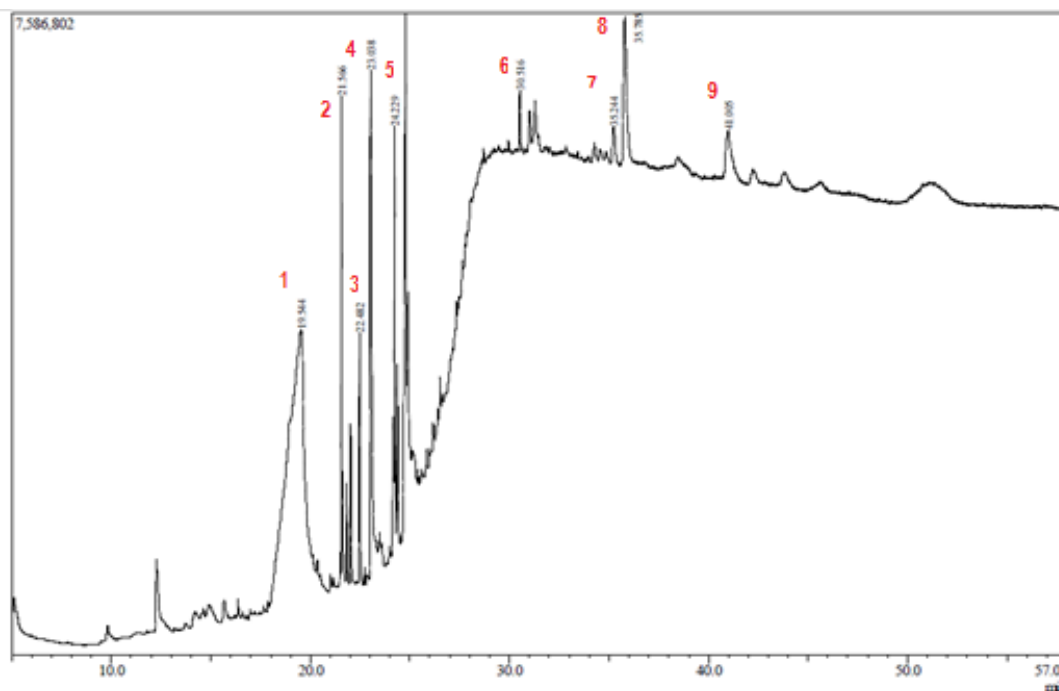


Tabela 4. Identificação dos compostos presentes do extrato metanólico das folhas de *C. ehrenbergiana*

Pico	Tempo de Retenção	Tempo inicial	Tempo final	Área (%)	Altura (%)	A/H	Nome
1	19.544	19.445	20.070	14.63	8.31	19.25	Ác 5-hidroxi-pipecólico
2	21.566	21.525	21.660	3.89	15.04	2.83	Fitol
3	22.482	22.405	22.605	2.01	7.67	2.87	Ácido palmítico
4	23.038	22.950	23.385	8.08	15.49	5.70	Ácido n-hexadecanóico
5	24.229	24.185	24.300	3.41	13.34	2.79	Ácido linolênico
6	30.516	30.445	30.620	10.39	12.03	9.44	Esqualeno
7	35.244	35.115	35.450	15.57	9.11	18.68	Estigmast-5-en-ol
8	35.785	35.590	36.155	28.50	12.23	25.47	Vitamina E
9	41.005	40.985	41.400	13.52	6.78	21.78	Gama-sitosterol

As substâncias identificadas no EMBCe por CG-EM foram: vitamina E (28,50%), estigmast-5-en-3-ol oleato (15,57%), ácido 5-hidroxi-pipecólico (14,63%), g-sitosterol (13,52%) e trans-esqualeno (10,39%). A vitamina E ocorre naturalmente em vegetais e o interesse por essa substância é cada vez maior por motivo de sua função como agente antioxidante, pela capacidade de remover radicais peroxil, interromper as reações de oxidação e assim proteger os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, mantendo-as integras (GRILO *et al.*, 2015; BARCIA *et al.*, 2010). Os sitosteróis apresentam estrutura química muito próxima a do colesterol, mas apresentam diferença na capacidade de absorção no trato intestinal, o sitosterol é relativamente não absorvível (BEST & DUNCAN, 1956). Em estudos, o sitosterol foi capaz de reduzir a concentração de colesterol sérico, da aorta e do fígado em coelhos com hipercolesterolemia induzida (HERRMANN, 1959). O ácido 5- hidroxi-pipecólico identificado tem relação com possível atividade antioxidante, é intermediário na síntese de flavona Baicalin, responsável pela atividade (COHEN, 1956). O esqualeno tem relatos de atividade antioxidante, desintoxicante, considerados substâncias importantes em usos práticos e clínicos (RAMESHKUMAR *et al.*, 2018). Também por cromatografia gasosa, Bedolla e colaboradores (2018) analisaram o extrato etanólico da espécie *Celtis palida* onde foram identificados os mesmos compostos presentes em menores quantidades do que no EMBCe: vitamina E (4,4%), Sitosterol (9,6%) e Esqualeno (0,4%). A vitamina E foi identificada no EMBCe em maior quantidade, o que pode contribuir para um efeito antioxidante. Foi possível comparar a presença de outros compostos nessas duas espécies, onde *C. palida* possui maior quantidade: ácido linolênico (11,1%) e ácido palmítico (4,6%). No mesmo gênero, ácido palmítico foi isolado da fração de

clorofórmio de *Celtis africana* por Al-Taweel e colaboradores (2012). As substâncias encontradas no EMBCe por CG-EM são os compostos majoritários encontrados na fração volátil ou volatilizável, entretanto, a busca por outras substância que possam estar presentes nos extratos das folhas de *C. ehrenbergiana* foi realizada através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência, trazendo dados para complementar a informação sobre sua composição química.

Os cromatogramas resultantes da análise dos extratos de *Celtis ehrenbergiana* foram comparados àqueles obtidos a partir da análise de de diferentes compostos fenólicos e flavonoides, empregados como substâncias de referência (figura 10). É possível observar que os tempos de retenção dos componentes majoritários dos extratos EMBCe e EALCe não correspondem aos das substâncias de referência. Mesmo assim não podemos descartar a possibilidade de presença de outros fenóis.

Figura 10. Cromatogramas referentes a: extrato metanólico (a); extrato aquoso (b) e mistura padrão dos compostos fenólicos na concentração de 8 mg/L (c). Os padrões referentes a cada pico estão descritos na tabela 5.

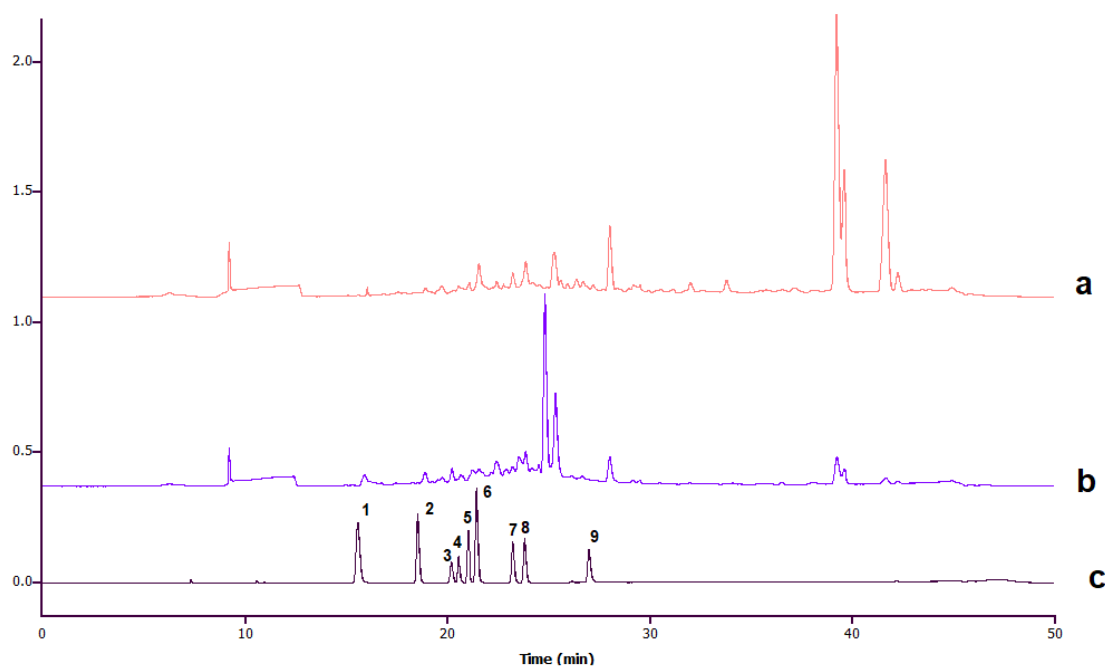
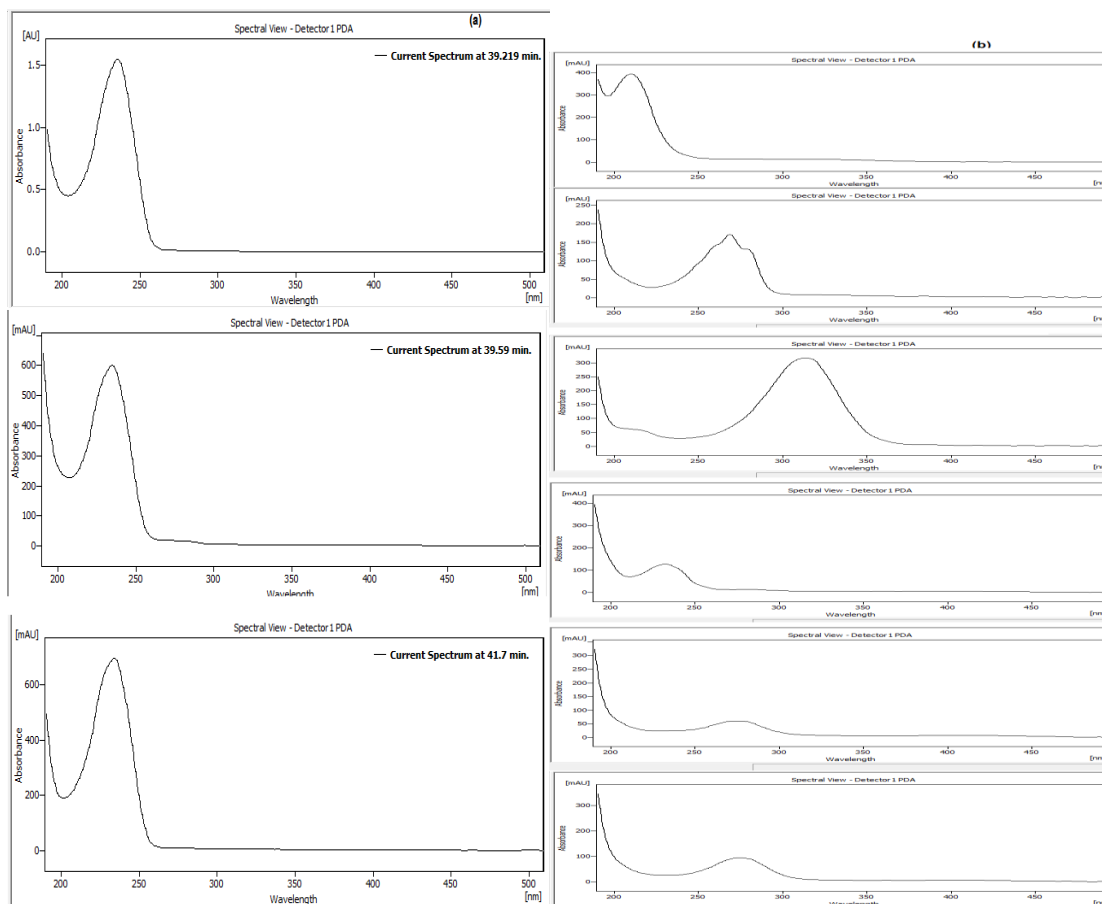


Tabela 5. Compostos fenólicos usados como padrões na identificação de extratos de *C. ehrenbergiana*

Nº pico	Composto	Y=ax+b	R ²	Faixa de trabalho
1	ác. Gálico	$y = 388,69x - 142,74$	0,9964	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
2	ác. 3,4-dihidroxibenzoico	$y = 300,9x - 93,422$	0,9980	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
3	ác. Clorogênico	$y = 106,2x - 41,062$	0,9704	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
4	Rutina	$y = 85,731x - 71,047$	0,9547	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
5	ác. Cafeico	$y = 277,75x - 97,544$	0,9984	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
6	ác. Siringico	$y = 395,71x - 135,58$	0,9969	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
7	ác. Cumárico	$y = 327,73x - 139,75$	0,9807	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
8	ác. Ferúlico	$y = 291,43x - 64,386$	0,9934	1.0 – 10 mg.L ⁻¹
9	Quercetina	$y = 191,97x - 108,44$	0,9962	1.0 – 10 mg.L ⁻¹

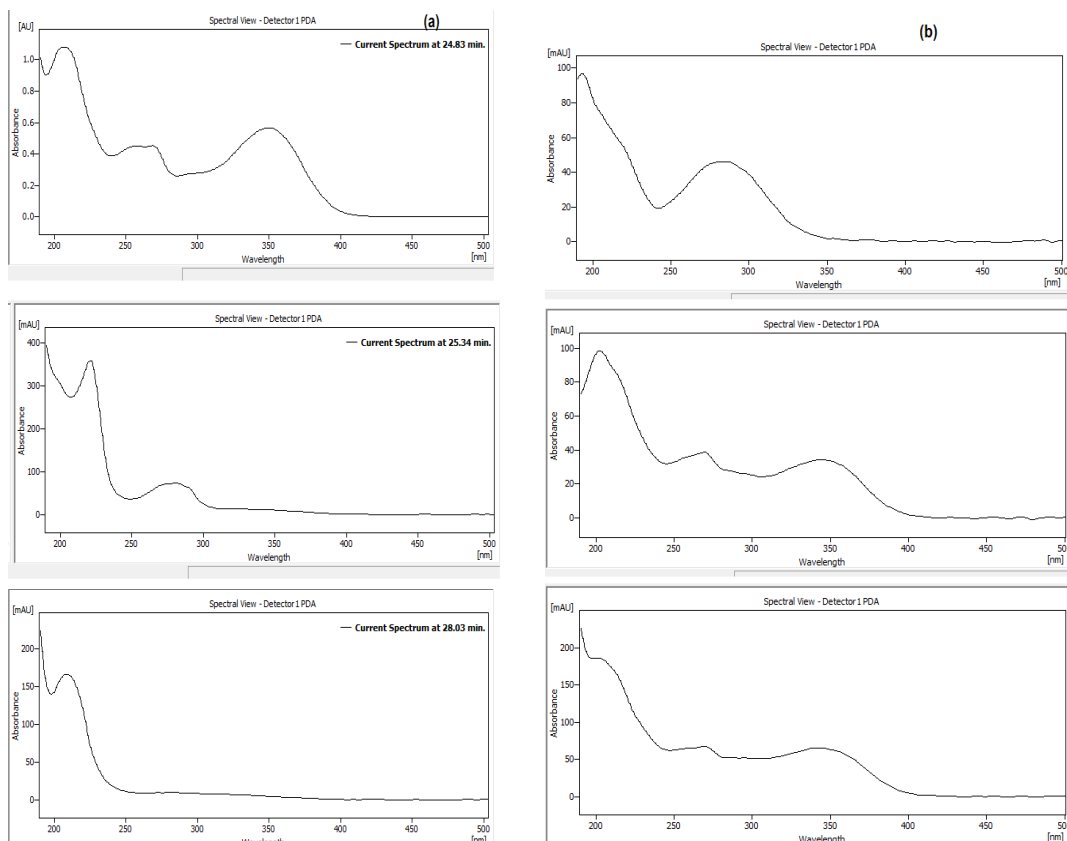
Na figura 11 estão apresentados os espectros UV obtidos dos picos do cromatograma de EMBCe, representado na figura 10a:

Figura 11: Espectros UV do EMBCe. Picos majoritários(a): pico 1= 39,21 min; 2= 39,59 min e; 3= 41,7 min. Outros picos encontrados (b): pico 1= 28,8 min; 2= 31,1min; 3= 32,01 min; 4= 42,2 min; 5= 42,9 min e; 6= 43,7 min.



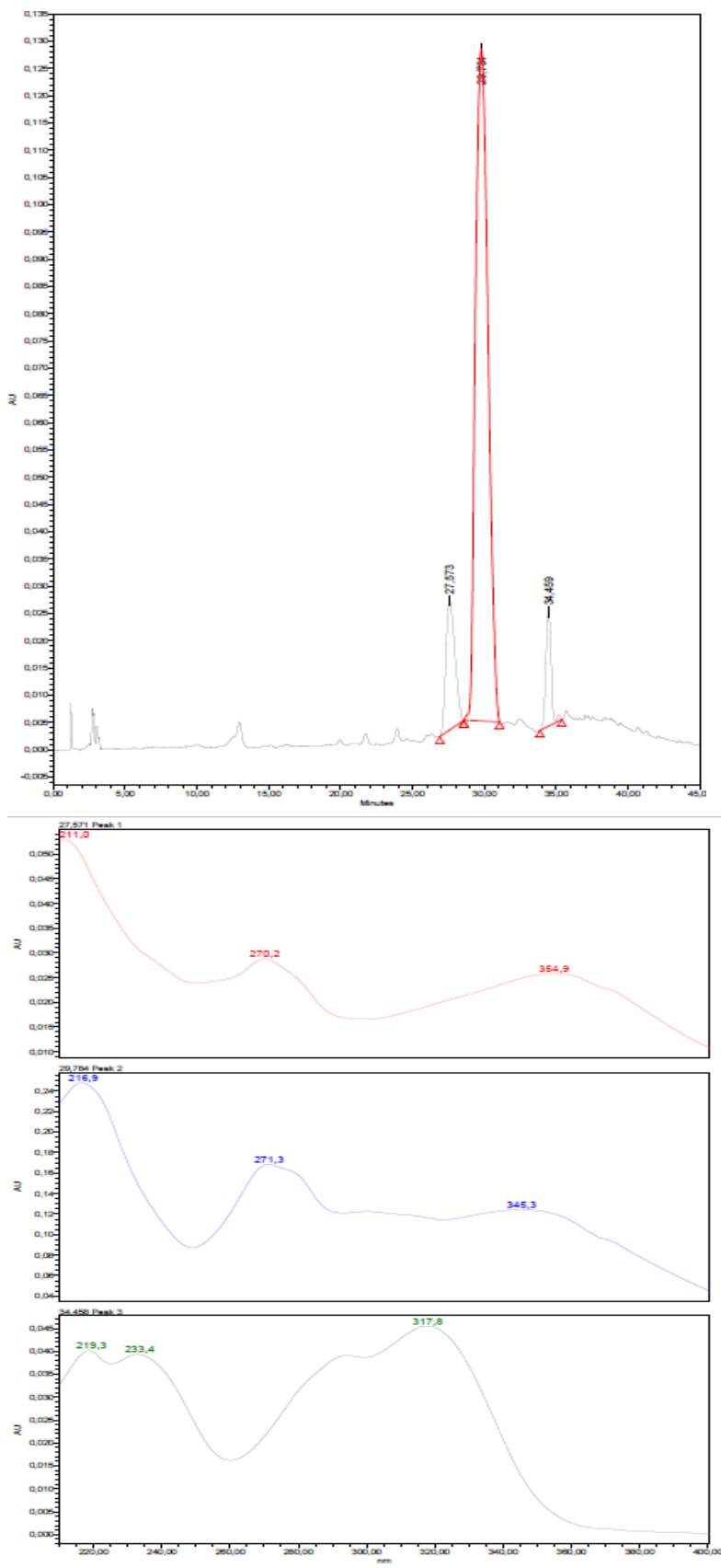
Na figura 12 estão apresentados os espectros do EALCe, referentes ao cromatograma expresso na figura 10b. A análise por CLAE-DAD do EALCe mostrou como resultado picos majoritários com máximos de absorção em 270nm e 350 nm:

Figura 12: Espectros UV do EALCe. Picos majoritários(a); pico 1= 24,83 min; 2= 25,34 min e; 3= 28,03 min. Outros picos encontrados (b): pico 1= 18,89 min; 2= 20,22 min e; 3= 23,85 min



Estudos realizados com outras espécies do gênero *Celtis* isolaram substâncias da classe de flavonóides C-glicosilados, a partir de suas folhas: Spitaler *et al.* (2009); Kaltenhauser *et al.* (2010); El-Alfy *et al.* (2011) isolaram de *C. australis* e *C. occidentalis* e; Perveen *et al.* (2011) avaliaram *C. africana*. Ambos foram encontrados na fração butanólica de cada extrato. Neste trabalho buscou-se a identificação de classes dos compostos presentes em *C. ehrenbergiana*, para comparação com as outras espécies. A partir dos resultados encontrados e dos dados científicos, foi avaliada outra fração com características polares, a fração butanólica (FB). O seguinte cromatograma foi obtido para a fração, com pico majoritário com tempo de retenção em 29 minutos:

Figura 13: Cromatograma (13a) e espectros UV (13b) obtidos da FB de *C. ehrenbergiana* por CLAE-DAD



O pico majoritário identificado na FB apresentou máximos de absorção em 271 nm e 345 nm, que pode ser comparado com os perfis espectrais do EALCe, ambos apresentaram bandas com valores máximos de absorção similares. A classe de flavonas C-glicosiladas é caracterizada por espectros UV com máximos de absorção em torno de λ 250nm a 285nm e λ 320 a 385nm (WANG *et al.*,2019). Moreira e colaboradores (2000) encontraram um composto C-glicosilflavona nas folhas de *Piper lhotzkyanum* que apresentou espectro UV com sinais em λ 287 e 330nm. Em *Celtis*, El-Alfy e colaboradores (2011) obtiveram espectro UV com características de flavona C- glicosilada para o composto isolado (absorção em 272 e 330 nm); em *C. africana*, Perveen e colaboradores (2011) encontraram espectro UV para Celtisídeos C-glicosilados (λ 275 e 328 nm), essas características foram identificadas nas frações mais polares (fração butanólica) de *Celtis*. A comparação dos espectros obtidos para os principais picos dos cromatogramas de EALCe e da fração butanólica com os dados da literatura apontam similaridades com os espectros de flavonoides C-glicosilados isolados de outras espécies vegetais, inclusive as do gênero *Celtis*. Assim podemos sugerir a presença de compostos com perfis de UV com máximos de absorção semelhantes aos dos flavonoides C-glicosilados de *Celtis* e de outros gêneros e famílias, trazendo informações sobre identificação da composição química da espécie. O método de extração no EALCe foi utilizado simulando o uso popular e de forma a extrair substâncias mais polares com atividades, também sendo importante a investigação de forma mais ampla com outros métodos.

Através dos relatos sobre o uso popular buscou-se investigar uma das possibilidades da espécie oferecer tal efeito para a população, já que a mesma possui características de compostos que têm relação com atividades antimicrobianas. Na Tabela 6 estão descritos os valores de MIC dos extratos e das frações de *C. ehrenbergiana* frente às espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 6 – Atividade antibacteriana de *C. ehrenbergiana*, avaliada através do teste de microdiluição em caldo

Bactérias	EALCe	EMBCe	FE	FDCM	FA	FB
<i>S. aureus</i> (29213)	C	AC-1024	AC-1024	AC-1024	AC-2048	C
<i>S. aureus</i> (25923)	C	AC-512	AC-512	AC-1024	AC-1024	AC-1024
<i>E. coli</i> (25922)	C	AC-512	AC-512	AC-1024	C	AC-2048
<i>P. aeruginosa</i> (27853)	C	AC-512	AC-256	AC-256	AC-2048	AC-512
<i>E. coli</i> (35218)	C	AC-1024	AC-256	AC-1024	AC-2048	AC-2048
<i>Acinetobacter</i>	C	AC-1024	AC-1024	AC-1024	AC-512	C
<i>St. coag neg.</i>	C	AC-1024	AC-1024	AC-512	AC-1024	C

* C: crescimento bacteriano; AC: ausência de crescimento a partir da concentração em $\mu\text{g/mL}$. FE: fração hexano; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; FB: fração butanol

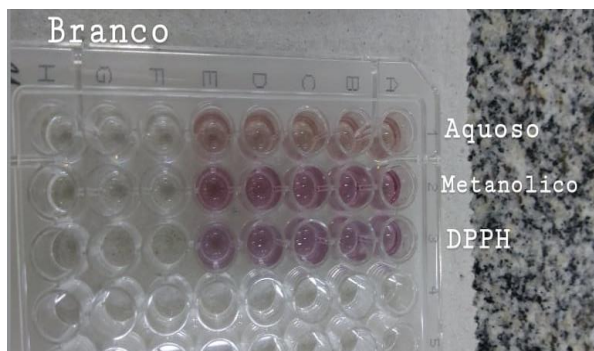
De um modo geral, a *C. ehrenbergiana* apresentou para as bactérias Gram-positivas MIC maior que $512 \mu\text{g/mL}$; enquanto que para as bactérias Gram-negativas, maior que $256 \mu\text{g/mL}$. Como é possível notar, o EALCe não apresentou inibição, e a FB apresentou crescimento bacteriano para algumas cepas. Alguns autores como Ayres e colaboradores (2008) consideram níveis de potencial antibacteriano dependendo das concentrações inibitórias: bom potencial se demonstram atividade em até $100 \mu\text{g/mL}$, atividade inibitória moderada de $100 - 500 \mu\text{g/mL}$, atividade fraca de $500 - 1000 \mu\text{g/mL}$ e quando maiores que $1000 \mu\text{g/mL}$ são considerados inativos. Porém de acordo com Cos e colaboradores (2006) para misturas de compostos, no caso extratos vegetais, os valores para ensaios devem estar abaixo de $100 \mu\text{g/mL}$ e abaixo de $25 \mu\text{g/mL}$ se for resultado de compostos puros. Sendo assim, *C. ehrenbergiana* não apresenta atividade antibacteriana que poderia ser considerada eficaz para essas cepas testadas, visto que: os valores de inibição não foram significantes; que a forma como a população utiliza a espécie é a decocção de suas folhas, constituídas de muitas substâncias e; que para obter a concentração utilizada no ensaio, a quantidade de vegetal deverá ser muito maior do que a usual na preparação do “chá”.

As espécies *C. palida* e *C. australis* já foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana, apresentando inibição do crescimento bacteriano nas concentrações de $400 \mu\text{g/mL}$ e superiores a $1250 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Ota *et al.*, 2017; Bedolla *et al.*, 2018). Dessa forma, é possível sugerir que a atividade antimicrobiana não seja responsável pelas motivações de uso popular da espécie, que envolvem o

emprego da decocção das folhas em aplicação tópica para o tratamento e cicatrização de afecções de pele. Embora o efeito cicatrizante possa derivar de diversos mecanismos de ação, muitos dos medicamentos de uso tópico dispensados como cicatrizantes são compostos por fármacos antibacterianos (como a pomada de neomicina + bacitracina - Nebacetin[®]), antifúngicos, anti-inflamatórios ou associações destes (cetoconazol + betametasona + neomicina = Trok-N[®]) (BRUNTON *et al.*, 2012; ANVISA, 2013). Assim, a ausência de atividade antibacteriana para *C. ehrenbergiana*, sugere que a ação bactericida não é a responsável pelo possível efeito da espécie sobre a cicatrização de feridas. Por outro lado, estes resultados não excluem a possibilidade de existência de efeito cicatrizante para a planta, o que motiva e direciona as próximas investigações com respeito às atividades farmacológicas da espécie e corrobora com a produção e disponibilização de dados sobre o gênero *Celtis*.

Neste estudo, o potencial antioxidante dos extratos de *C. ehrenbergiana* foi avaliado pela capacidade de sequestro de radicais livres, por meio da reação com DPPH. O DPPH possui cor violeta que perde a intensidade ou se torna amarelo pálido, ao reagir com a substância antioxidante (OLIVEIRA, 2015).

Figura 14: Microplaca do teste de reação com DPPH.



Os resultados do teste permitiram observar que o extrato aquoso apresentou maior grau de reação com o radical livre DPPH (38%) que o extrato metanólico (20%). No EALCe foi identificado maior teor de taninos e possível presença de C-heterosídeos, taninos são moléculas poliméricas, capazes de reagir com radicais livres, pois a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos depende de vários fatores, principalmente estruturais, incluindo o número de grupos hidroxila ou metoxila fenólicos (MENDILI, 2019). Heterosídeos C-glicosilados também possuem relatos de atividade antioxidante: Ota e colaboradores (2017) identificaram que as

folhas de *C. australis* possuem maior conteúdo de polifenóis nos estágios iniciais de desenvolvimento e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante. El- Alfy e colaboradores (2011) verificaram que a substância c-glicosil flavonoide, isolada de *C. australis* e *C. occidentalis* apresentou maior atividade antioxidante, seguida pela fração butanólica e pelo extrato etanólico e superior à obtida para α -tocoferol e BHT, substâncias empregada como padrão. Ambas as espécies se caracterizam pela presença de flavonoides C-glicosilados em sua composição química, aos quais foi atribuída a ação antioxidante das espécies.

Os métodos para avaliação da capacidade antioxidante podem variar dependendo do tipo de radical livre ou de seu comportamento. Nos ensaios para avaliar a peroxidação lipídica, é mensurado o grau de inibição da oxidação de um lípidio ou substrato lipoproteico sob condições padrão: ensaio que detecta as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como resultado da peroxidação lipídica, (TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances*); sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, nos permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Os testes podem ainda avaliar a habilidade de sequestro de radicais livres:

1. remoção de um radical peroxila - capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC - *oxygen radical absorbance capacity*); potencial reativo antioxidante total (TRAP - *total reactive antioxidant potential*);
2. capacidade de redução de metal - poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP - *ferric reducing antioxidant power*); capacidade antioxidante de redução de íons Cobre (CUPRAC - *cupric ion reducing antioxidant capacity*);
3. capacidade de remoção de radical orgânico - o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) é uma substância utilizada para estimar o potencial antioxidante de substâncias ou misturas, reagindo e formando radical catiônico ABTS \bullet +; eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH \bullet).

Cada teste determina de forma diferente o efeito nos radicais que é influenciado pela sua reatividade com o antioxidante e também pela sua concentração (OLIVEIRA, 2015). O ensaio com DPPH realizado no estudo é um indício de que *Celtis ehrenbergiana* pode apresentar efeitos antioxidantes devido a

um possível sequestro de radicais livres, sendo necessários outros tipos dos testes antioxidantes para afirmação de que a espécie possa apresentar atividade promissora. Em avaliação do EALCe que simulou o uso popular, foi possível encontrar altos teores de polifenóis, e evidências de heterosídeos C-glicosilados, favorecendo para o efeito de reação com o DPPH, que devido a suas estruturas podem doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH•, tornando-se uma molécula estável, na forma reduzida DPPH-H. Não foi possível isolar os compostos majoritários de *Celtis ehrenbergiana*, mas foram caracterizados perfis espectrais semelhantes aos encontrados para C-glicosilados em outros estudos, sugerindo a presença desses na espécie, que podem causar efeito desejável, quando comparado com outras espécies de *Celtis* que tiveram atividade antioxidante aumentada com teores elevados de polifenóis, ou ainda apresentaram efeito maior que os padrões antioxidantes, quando tiveram substâncias C-glicosiladas isoladas (Ota *et al.*, 2017; El-Alfy *et al.*, 2011; Perveen *et al.*, 2011).

Conclusão

Este é o primeiro estudo sobre a espécie *Celtis ehrenbergiana*, que pode contribuir para a literatura científica de sua composição química, sendo o pontapé inicial para que se possa saber mais sobre a espécie e sobre o gênero, devido a análise por CLAE-DAD sugerir a presença de compostos com máximos de absorção semelhantes aos dos flavonóides C-glicosilados e assim como outras *Celtis*, essa espécie produzir o mesmo tipo de compostos, colaborando com dados que ajudam a elucidar a quimiotaxonomia do gênero, pois como já foi citado, Cannabaceae caracteriza-se pela presença de glicosilflavonas não hidrolisáveis (C-glicosilados) enquanto Ulmaceae contém derivados hidrolisáveis de flavonas (O-glicosilados) ou flavonas simples (SPITALER *et al.*, 2009; OTA *et al.*, 2017). Os extratos das folhas de *C. ehrenbergiana* apresentaram alto teor de polifenóis e flavonoides totais quando comparados com outra espécie de *Celtis* (OTA *et al.*, 2017; ADEPAPO *et al.*, 2009), o que pode ser responsável pelas atividades possíveis de uso medicinal. Quando avaliada composição dos extratos, não foi possível encontrar a presença de polifenóis mais abundantes, como ácidos fenólicos e flavonoides, porém no gênero *Celtis* encontram-se relatos da presença de flavonoides mais raros, os C-

glicosilados, os quais foram buscados na espécie deste estudo e comparando com dados literários foi possível a identificação da classe de compostos característicos do gênero. Nenhum dos extratos produziu efeito antibacteriano eficaz (COS *et al.*, 2006), que possa comprovar a cicatrização de afecções de pele, o que não descarta que pode esse efeito ser causado por outra atividade da espécie.

DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho não foram isolados os componentes presentes nos extratos da espécie *Celtis ehrenbergiana*, porém em caráter de composição química, foi possível caracterizar a presença da classe de compostos C-glicosilflavonoides tendo em vista que seus extratos apresentaram característica espectral com máximos de absorção em 270 nm e 350 nm, similar aos isolados em outras espécies do mesmo gênero e sugerir que assim como as outras *Celtis* constituídas por c-glicosilados que apresentam máximos de absorção na mesma faixa (EL-ALFY *et al.*, 2011; PERVEEN *et al.*, 2011), *C. ehrenbergiana* pode apresentar na sua composição a mesma classe desses metabólitos. Como a espécie é usada popularmente para cicatrização de enfermidades tópicas, esses efeitos poderiam ser atribuídos a ação antimicrobiana visto que: pomadas para tratamento de acne contêm princípios bactericidas como a Clindoxyl® (peróxido de benzoíla+ clindamicina, cuja função é inibir o crescimento da bactéria *Propionibacterium acnes*) e para o tratamento de infecções de pele como a Nebacetin® (Neomicina + Bacitracina, dois antibióticos que inibem o crescimento de diferentes bactérias), em *C. ehrenbergiana* não foi possível relacionar o uso popular com atividade antimicrobiana o que não descarta o poder cicatrizante por outros mecanismos, como a Trok® constituída por associação de antiinflamatório e antifúngico. Esses flavonoides raros isolados em *Celtis* foram atribuídos a atividades antioxidantes, extratos das espécies *C. australis* e *C. occidentalis* apresentaram efeitos maiores quando comparados com as substâncias empregadas como padrão antioxidante (BHT e α -tocoferol) (El- Alfy *et al.*, 2011), está em investigação poder antioxidante de *C. ehrenbergiana*, seu extrato aquoso apresentou maior reação com o radical DPPH do que o extrato metanólico, podendo ser resultado dos compostos possivelmente presentes na espécie.

CONCLUSÃO

A espécie estudada mostrou semelhança com as espécies do mesmo gênero, devido a identificação de características apresentadas pelos metabólitos isolados no gênero *Celtis*. Essas substâncias são mais raras e mais resistentes e apresentaram atividade antioxidante relacionada, sendo importante a caracterização delas em *Celtis ehrenbergiana*.

REFERÊNCIAS

- ACQUAVIVA, R.; SORRENTI, V.; SANTANGELO, R.; CARDILE, V.; TOMASELLO, B.; MALFA, G.; VANELLA, L.; AMODEO, A.; GENOVESE, C.; MASTROJENI, S.; PUGLIESI, M.; RAGUSA, M.; GIACOMO, C. Effects of an extract of *Celtis aetnensis* (Tornab.) Strobl twigs on human colon cancer cell cultures. **Oncology Reports**, v.36 (4), out., 2016.
- ADEDAPO, A.A.; JIMOH, F.O.; AFOLAYAN, A.J.; MASIKA, P.J. Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Celtis africana*. **Rec. Nat. Prod.**, v.3: 1, p.23-31, 2009.
- AL-TAWEEL, A.M.; PERVEEN, S.; EL-SHAFAE, A.M.; FAWZY, G.A.; MALIK, A.; AFZA, N.; IQBAL, L.; LATIF, M. Bioactive phenolic amides from *Celtis africana*. **Molecules**, v.17, p.2675-2682, 2012.
- ALENCAR, E. M.; CAJAIBA, R. L.; MARTINS, J. S. C.; CORDEIRO, R. S.; SOUSA, E. S.; SOUSA, V. A.. Estudo etnobotânico do conhecimento e uso das plantas medicinais no município de Buriticupu, Maranhão, Brasil. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.6, p.328-338, 2019
- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES C. M. O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos a base de Ginkgo ou Ginseng. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18 (1): p.117-126, Jan./Mar. 2008.
- AMBRIZ- PÉREZ, D.L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P.; HEREDIA, J.B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, n.1, p.1-14, 2016.
- BADONI, R. SEMWAL, D.K.; BADONI, P.P.; KOTHIYAL, S.K.; RAWAT, U. A novel bacteriohopanoid from *Celtis australis* L. bark. **Chinese Chemical Letters**, v.22, p.81–84, 2011.
- BARCIA, M.T.; JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P.B.; ZAMBIAZI, R.C. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Semina: ciências agrárias**, v.31, p.381-390, 2010.
- BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.de.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes. **Química Nova**, v.29, p.1352-1360, 2006.
- BEDOLLA, E.I.R.; PEREZ, J.L.G.; LOPEZ, M.I.A.; CHAVEZ, M.M.G.; MORALES, J.R.Z.; MACIAS, C.L.M.; ALVAREZ, C.C.; MIRANDA, J.J.M.; ALVAREZ, M.A.D.; CASTRO, A.J.A. Chemical characterization, pharmacological effects, and toxicity of an ethanol extract of *Celtis pallida* Torr. (Cannabaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.219, p. 126–132, 2018.

BEST, M.M & DUNCAN, C.H. Modification of abnormal serum lipid patterns in atherosclerosis by administration of sitosterol, 1956.

BORGES, F.F.V. MACHADO, T.C.; CUNHA, K.S.; PEREIRA, K.C.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R.de.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.. 85 (3): p.955-963, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bula para profissional da saúde: Nebacetin®. Brasília, DF: ANVISA; 2013. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=21331052016&pIdAnexo=3776379.

BRANDÃO, Maria das Graças Lins. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. In: SIMÕES, Claudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; MELLO, João Carlos Palazzo, de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (org). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 29-38.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012

CARVALHO, A.R.; COSTA, G.; FIGUEIRINHA, A.; LIBERAL, J.; PRIOR, J.A.V.; LOPES, M.C.; CRUZ, M.T.; BATISTA, M.T. *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Research International**, v.99, p.485–494, 2017.

CASTRO, A.V.; PORRINI, D.P.; CICCHINO, A.C. Annual Activity Density of groundbeetles (Coleoptera: Carabidae) of a *Celtis ehrenbergiana* (Rosales: Celtidaceae) Forest of Buenos Aires Province, Argentina. **Journal of Insect Science**, v. 14, 2014.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S25 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2015.

COHEN, L. A.; IRREVERRE, F.; PIEZ, K.A.; WITKOP, B.; WOLFF, H.L.. Synthesis of 5-Hydroxypipicolinic Acid and Separation of Its Diastereoisomers. **Science**, v. 123, n. 3202, p. 842-843, 1956.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p. 290-302, 2006.

DACY, E.C.; FULBRIGHT, T.E. Survival of Sprouting Shrubs Following Summer Fire: Effects of Morphological and Spatial Characteristics. **Rangeland Ecology Management**, v. 62, p. 179-185, 2009.

DEMIR, F.; DOGAN, H.; OZCAN, M.; HACISEFEROGULLARI, H. Nutritional and physical properties of hackberry (*Celtis australis* L.). **Journal of Food Engineering**, v.54: p.241–247, 2002.

DERAKHSHAN, Z.; FERRANTED, M.; TADIE, M.; ANSARIE, F.; HEYDARIF, A.; HOSSEINI, M.S.; CONTI, G.O.; SADRABADE.K. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p.108-111, 2018.

EL-ALFY, T.S. EL-GOHARY, H.M.A.; SOKKAR, N.M.; HOSNY, M.; AL-MAHDY, D.A. A new flavonoid C-Glycoside from *Celtis australis* L. and *Celtis occidentalis* L. leaves and potential antioxidant and cytotoxic activities. **Scientia Pharmaceutica**, v.79: p.963–975, 2011.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.de.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G. Historical context, popular use and scientific conception on medicinal plants. *Cadernos de pesquisa*, São Luís, v.18, 2011.

FIRMO, W.C.A.; MIRANDA, M.V.; COUTINHO, G.S.L.; SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G. Phytochemical study and evaluation of antibacterial activity of *Lafoensia pacari* (Lythraceae). *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, v.20, n.1, p. 7-12, jan./jun. 2014.

FRANÇA, I.S.X. de.; SOUZA, J.A.de.; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem*, Brasília, v. 61, nº 2, 2008.

FULBRIGHT, T.E.; DACY, E.C.; DRAWE, D.L. Does browsing reduce shrub survival and vigor following summer fires. **Acta Oecologica**, v.37, p.10-15, 2011.

GANN, W.J.; FULBRIGHT, T.E.; GRAHMANN, E.D.; HEWITT, D.G.; DeYOUNG, C.A.; WESTER, D.B.; KORZEKWA, B.A.; ECHOLS, K.N.; DRAEGER, D.A. Does Supplemental Feeding of White-tailed Deer Alter Response of Palatable Shrubs to Browsing? **Rangeland Ecology & Management**, v.69, p. 399-407, 2016.

GONG, J.; XIA, D.; HUANG, J.; GE, Q.; MAO, J.; LIU, S.; ZHANG, Y. Functional Components of Bamboo Shavings and Bamboo Leaf Extracts and Their Antioxidant Activities In Vitro. **Journal of medicinal food**, v.18, p. 453-459, 2015.

GRILLO, E.C.; COSTA, P.N.; GURGEL, C.S.S.; BEZERRA, D.F.; BELLOT, P.E.N.R.; DIMENSTEIN, R. Influência do tempo de armazenamento sobre a concentração de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em óleos vegetais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.74, p.216-224, 2015.

GROCHANKE, B.S.; GEHRKE, I.T.S.; GOETTEMS-FIORIN, P.B.; BRUXEL, M.A.; BASSO, E.G.P.; HECK, T.G.; LUDWIG, M.S. Compostos fenólicos da casca de *Handroanthus heptaphyllus* (Mart.) Mattos e efeitos do extrato aquoso no perfil lipídico, glicêmico e na lipoperoxidação em ratos diabéticos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.264-272, 2016.

HAN, H.; YILMAZ, H.; GULÇIN, I. Antioxidant Activity of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) shell and Analysis of Its Polyphenol Contents by LC-MS/MS. **Records of natural products**, v.12, p. 397-402, 2018.

HERRMANN, R.G. Effect of taurine, glycine and β - sitosterols on serum and tissue cholesterol in the rat end rabbit. **Circulation Research**, v.11, p. 224-227, 1959.

HIDALGO, E.M.P.; MOREIRA, F.A.; GAGLIANO, J.; CARVALHO, W.R.S.de.; SILVA, F.N. da.; RAIMUNDO, S.G.; SAITO, L.C.; NAVARRO, B.V.; NETO, A.A.C.; DIAS, D.L.O. VI Botânica no Inverno 2016. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, v.6, p. 1-223, 2016.

HWANG, B.Y.; CHAI, H.B.; KARDONO, L.B.S.; RISWAN, S.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. **Phytochemistry**, v.62, p. 197–201, 2003.

HICHRI, F.; SALAH, N.B.; OMRI, A.; HOSSAN, A. S. M.; JANNET, H.B. New antioxidant C-glycosyl flavone and flavonol derivatives from the Tunisian *Achillea cretica* L. **South african journal of botany**, v.116, p.1-5, 2018.

IMAMURA, P.M. & BAPTISTELLA, L.H.B. Nitração do fenol, um método em escala semi-micro para disciplina prática de 4 horas. **Química Nova**, v. 23, p. 270-272, 2000.

KIM, H.G.; CHOI, S.; LEE, J.; HONG, Y.H.; JEONG, D.; YOON, K.; YOON, D.H.; SUNG, G.H.; LEE, S.; HONG, S.; YI, Y.S.; KIM, J.H. CHO, J.Y. Src Is a Prime Target Inhibited by *Celtis choseniana* Methanol Extract in Its Anti-Inflammatory Action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-17, 2018.

KOKSAL, E.; BURSAL, E.; GULÇIN, I.; KORKMAZ, M.; CAGLAYAN, C.; GOREN, A.C.; ALWASEL, S.H. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **International Journal of Food Properties**, v.20, p. 514-525, 2017.

KREIS, Wolfgang; MUNKERT, Jennifer; PÁDUA, Rodrigo Maia de. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In SIMÕES, Claudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; MELLO, João Carlos Palazzo, de; MENTZ, Lilian Auler;

PETROVICK, Pedro Ros (org). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. P. 147-166.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, p.123-128, 2007.

MACHADO, Gabriela. **Determinação da atividade antifúngica de *Acca sellowiana***. Porto Alegre – RS, 2015.

MACHADO, M.M.; DE OLIVEIRA, L.F.S.; ZURAVSKI, L. DE SOUZA, R.O.; FISCHER, P.; DUARTE, J.A.; ROCHA, M.O.; GUEX, C.M.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.88, p. 17-28, 2016.

MACIEL, M.J.; SILVA, M.A.S.; ETHUR, E.; AVANCINI, C.A.M. Phytochemical indicators and antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* ("macela") against antibiotic-resistant *Salmonella* spp. isolated from animal products (swine and poultry). **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary**, v. 11, n.3, p. 273-287, 2017.

MARTÍNEZ, G.J.; LUJÁN, M.C. Medicinal plants used for traditional veterinary in the Sierras de Córdoba (Argentina): an ethnobotanical comparison with human medicinal uses. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.7:23, 2011.

MARTÍNEZ, G.J. Cultural patterns of firewood use as a tool for conservation: A study of multiple perceptions in a semiarid region of Cordoba, Central Argentina. **Journal of Arid Environments**, v.121, p.84-99, 2015.

MARTINS, J.L.R.; SOUZA, F.B.; FAJEMIROYE, J.O.; GHEDINI, P.C.; FERREIRA, P.M.; COSTA, E.A. Anti-ulcerogenic and antisecretory effects of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent hexane leaf extract. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, p.250-255, 2014.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 294-298, jul./set. 2010.

MAZZARI, A.L.D.A; PRIETO, J.M. Pharmacovigilance in Brazil: the monitoring of herb-drug interactions using pharmacokinetic data. **Infarma, Ciências Farmacêuticas**, v.26, e.3, p.193-198, 2014.

MESSIAS, M.C.T.B.; MENEGATTO, M.F.; PRADO, A.C.C.; SANTOS, B.R.; GUIMARÃES, M.F.M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico

dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MENDILI, M.; BANNOUR, M.; ARAUJO, M.E.M.; ASCHI-SMITI, S.; SEAWARD, M, R, D.; KHADHRI, A. Secondary Metabolites and Antioxidant Capacity of the Tunisian Lichen *Diploschistes ocellatus* (Ascomycota). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, p.817–823, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 60 p., 2006.

MORRISON, I.; ASIEDU, E.; STUCHBURY, T.; POWELL, A. Determination of lignin and tannin contents of cowpea seed coats. **Annals of Botany**, 76: 287-290, 1995.

NOBREGA, J.S.; SILVA, F.A. da.; BARROSO, R.F.; CRISPIM, D.L.; OLIVEIRA, C.J.A. Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, p. 1-7, 2017.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 supl 2, p. 05-08, 2003.

OLIVEIRA, V.B.de.; MEZZOMO, T.R.; MORAES, E.F.de. Conhecimento e Uso de Plantas Mediciniais por Usuários de Unidades Básicas de Saúde na Região de Colombo, PR. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.22, p57-64,2018.

OLIVEIRA, I.S.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R.M.; MARTINS, D.T.O. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18(4), p.587-593, Out./Dez. 2008.

OSÓRIO, T. M.; MONACHE, F.D.; CHIARADIA, L.D.; MASCARELLO, A.; STUMPF, T.R.; ZANETTI, C.R.; SILVEIRA, D.B.; BARARDI, C.M.; SMÂNIA, E.A.; VIANCELLI, A.; GARCIA, L.T.; YUNES, R.A.; NUNES, R. J.; SMÂNIA, A. Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 225–230, 2012.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18(2), p.301-307, Abr./Jun. 2008.

OTA, A.; VISNJEVEC, A.M.; VIDRIH, R.; PRGOMET, Z.; NECEMER, M.; HRIBAR, J.; CIMERMAN, N.G.; MOZINA, S.S.; BUCAR-MIKLAVCIC, M.; ULRIH, N.P. Nutritional, antioxidative, and antimicrobial analysis of the Mediterranean hackberry (*Celtis australis* L.). **Food Science & Nutrition**, v.5(1), p.160–170, 2017.

PAULA, M.A. COUTO, R.O.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A. Caracterização farmacognóstica da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29 n.4, 2010.

PATONAY, K.; SZALONTAI, H.; CSUGÁNY, J.; SZABÓ-HUDAK, O.; KONYA, E.P.; NÉMETH, E.Z. Comparison of extraction methods for the assessment of total polyphenol content and in vitro antioxidant capacity of horsemint (*Mentha longifolia* (L.) L.). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.15, p.1-7, 2019.

PELOI, K.E. BOVO, F.; MESSIAS-REASON, I.J.; PEREZ, E. Utilização de planejamento fatorial para a determinação da capacidade antioxidante e doseamento de flavonoides totais em *Verbena minutiflora* Briq. ex Moldenke (gervai). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, p.1-8, 2016.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista Saúde Pública**, v.38 n.2, 326-328, 2004.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 21-24, 2003.

RAYMUNDO, C.E.V. et al. VII Botânica no Inverno, capítulo XIX, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318429331_Nutricao_mineral_avaliando_a_escassez_nutricional_em_plantas

RAMESHKUMAR, R.; SATISH, L.; PANDIAN, S.; RATHINAPRIYA, P.; RENCY, A.S.; SHANMUGARAJ, G.; PANDIAN, S.K.; LEUNG, D.W.M.; RAMESH, M. Production of squalene with promising antioxidant properties in callus cultures of *Nilgrianthus ciliatus*. **Industrial Crops & Products**, v.126, p.357-367, 2018.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.69, p.153-158, 1994.

RIO, R.G.W. 1996. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROZATTO, Mariana. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Araraquara-SP, 2012.

RUFINO, M.S, et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico *on line*. *Comitê de Publicações Expediente Comunicado Técnico*, 127. Fortaleza, 2007.

SAHA, S. & VERMA, R.J. Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula* Retzius fruits. **Journal of Taibah University for Science**, v.10, p.805-812, 2016.

SALEM, A.Z.M. Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifies *in vitro* gas production of other tree leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.94– 101, 2012.

SANTOS, A.E.; JUNIOR, C.B.B.; KUSTER, R.N. Flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p.1303-1317, 2017.

SANTURIO, J.M.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S. H. Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enterica* sorovars from avian source. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 803-808, mai/jun, 2007.

SILVA, J.M.da. MOTTA, E.V.S.; MENDES, R.F.; SCIO, E. Caracterização fitoquímica, teor de fenois e flavonoides e avaliação da capacidade antioxidante da folhas de *Lacistema pubescens* mart. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 37, n. 3, p. 347-352, jul./set. 2012.

SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S.; NEVES JR, I. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinífera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p.143-148, Abr./Jun. 2005.

SILVEIRA, P.F.da.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.4, p.618-626, Out./Dez. 2008.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.da.; MENDES, J.C. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb). **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n.5, p. 589-594, set/out, 2010.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SINGH, M.K.; PANDEY, A.; SAWARKAR, H.; GUPTA, A.; GIDWANI, B.; DHONGADE, H.; TRIPATHI, D.K. Methanolic extract of *Plumbago Zeylanica* – a remarkable antibacterial agent against many human and agricultural pathogens. **Journal of Pharmacopuncture**, v.20, n.1, p.018-022, 2017.

SOARES, S.P.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* on dental caries microorganisms. **Rev. odonto ciênc.**, v.23, n.2, p.141-144, 2008.

SOMMAVILLA, V.; HAIDACHER-GASSER, D.; SGARBOSSA, M.; ZIDORN, C. Seasonal variation in phenolics in leaves of *Celtis australis* (Cannabaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.41, p.110–114, 2012.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.3, p.23-29, 2007.

SOUZA, F.B. de.; MARTINS, J.L.R.; FLORENTINO, I.F.; COUTO, R.O.; NASCIMENTO, M.V.M.; GALDINO, P.M.; GHEDINI, P.C.; PAULA, J.R. de.; COSTA, E.A. Preliminary studies of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves (Ulmaceae). **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, p.1-6, 2012.

SOUZA, J.N.P.; CANDOTTI, J.G.; AMPARO, T.R.; COELHO, F.F.; RODRIGUES, I.V.; SANTOS, O.D.H.dos.; MEDEIROS, L.F.T.de.; FURTADO, N.A.J.C.; SOUZA, H.C.de.; SOUZA, G.H.B.de. Bioprospection of antioxidant and antimicrobial activities of medicinal plants species collected in ouro preto – MG. **Revista Eletrônica de farmácia**, vol. X, n.1, p.01 - 15, 2013.

SPITALER, R.; GURSHLER, S.; ELLMERER, ERNST.; SCHUBERT, B.; SGARNOSSA, M.; ZIDORN, C. Flavonoids from *Celtis australis* (Cannabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, p.120–121, 2009.

TAMBORENA, T., GULARTE, C. A. O., ESCOTO, D. F., GAYER, M. C., ROEHRS, R., FOLMER, V., ÁVILA, D. F., PUNTEL, R. L. 2015. Antioxidant activity of some medicinal plant extracts: implications for neuroprotection. **Pharmacologia**. 6. 282-292.

TOHMA, H.; GULÇIN, I.; BURSAL, E.; GOREN, A.C.; ALWASEL, S.H.; KOKSAL, E. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. **Food Measure**, v. 11, p. 556-566, 2017.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Popular phytotherapy: the instrumental search as a therapy. **Texto & Contexto Enfermagem**, vol. 15, n. 1, p. 115-121, jan/mar, 2006.

TORRES, R.B & LUCA, A.Q. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, v.4, p.361-270, 2005.

TREVISAN, R.R.; LIMA, C.P.; MIYAZAKI, C.M.S.; PESCI, F.A.; SILVA, C.B.; HIROTA, B.C.K.; LORDELLO, A.L.L.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; ZANIN, S.M.W. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.3, p.494-499, 2012.

VASCONCELOS JR, A.A.; MENEZES, E.E.; CUNHA, F.A.; CUNHA, M.C.S.O.; BRAZ, B.H.L.; CAPELO, L.G.; SILVA, C.L.F. Comparison of microdilution broth and disk diffusion for antifungal susceptibility testing against *Candida* spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 135-142, 2012.

VEIGA JR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(4): 361-372, Out./Dez. 2005.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(1): 28-34, Jan./Mar. 2010.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J.F.G.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(2): 137-142, Abr./Jun. 2005.

WEN, L.; ZHAO, Y.; JIANG, Y.; YU, L.; ZENG, X.; YANG, J.; TIAN, M.; LIU, H.; YANG, B. Identification of a flavonoid C-glycoside as potent antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v.110, p. 92-101, 2017.

ANEXO A – Normas da Revista The Scientific World Journal

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online manuscript tracking system. Only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS, and there is no page limit. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the manuscript during submission and peer review. For technical help contact help@hindawi.com.

Terms of submission

Manuscripts must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are only being considered by this journal. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the submitting author's responsibility to ensure that the article has all necessary institutional approvals. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication, unless otherwise indicated. It is a condition of submission that the authors permit editing of the manuscript for readability. All inquiries concerning the publication of accepted manuscripts should be addressed to help@hindawi.com. All submissions are bound by Hindawi's terms of service.

Research Articles

Research articles should present the results of an original research study. These manuscripts should describe how the research project was conducted and provide a thorough analysis of the results of the project. Systematic reviews may be submitted as research articles.

Title and Authorship Information

The following information should be included:

Manuscript title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained, citation-free, and should not exceed 300 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

The methods section should provide enough detail for others to be able to replicate the study. If you have more than one method, use subsections with relevant headings, e.g. different models, in vitro and in vivo studies, statistics, materials and reagents, etc.

Hindawi journals have no space restriction on methods. Detailed descriptions of the methods (including protocols or project descriptions) and algorithms may also be uploaded as supplementary information or a previous publication that gives more details may be cited. If the method from a previous article is used then this article must be cited and discussed. If wording is reused from a published article then this must be noted, e.g. This study uses the method of Smith et al. and the methods description partly reproduces their wording [1].

If a method or tool is introduced in the study, including software, questionnaires, and scales, the license this is available under and any requirement for permission for use should be stated. If an existing method or tool is used in the research, the authors are responsible for checking the license and obtaining any necessary permission. If permission was required, a statement confirming permission was granted should be included in the Materials and Methods section.

Results and Discussion

This section may be divided into subsections or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the article, highlighting its importance and relevance.

Data Availability

This statement should describe how readers can access the data supporting the conclusions of the study and clearly outline the reasons why unavailable data cannot be released.

Conflicts of Interest

Authors must declare all relevant interests that could be perceived as conflicting. Authors should explain why each interest may represent a conflict. If no conflicts exist, the authors should state this. Submitting authors are responsible for coauthors declaring their interests.

Funding Statement

Authors must state how the research and publication of their article was funded, by naming financially supporting body(s) (written out in full) followed by associated grant number(s) in square brackets (if applicable), for example: "This work was supported by the Engineering and Physical Sciences Research Council [grant numbers xxxx, yyyy]; the National Science Foundation [grant number zzzz]; and a Leverhulme Trust Research Project Grant".

If the research did not receive specific funding, but was performed as part of the employment of the authors, please name this employer. If the funder was involved in the manuscript writing, editing, approval, or decision to publish, please declare this.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the manuscript before the references. Anyone who made a contribution to the research or manuscript, but who is not a listed author, should be acknowledged (with their permission).

References

Authors may submit their references in any style. If accepted, these will be reformatted in Chicago style by Hindawi. Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references should be numbered consecutively in the order of their first citation. Citations of references in the text should be identified using numbers in square brackets e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”. All references should be cited within the text and uncited references will be removed.

Date formatting

Hindawi recommends writing dates out fully to avoid confusion with different all-numeral date styles. For example, 11/10/2018 could be 10 November 2018 or 11 October 2018 depending on the reader, therefore, the date should be written out in full. For example, the date September 1, 2018 can be used rather than 01/09/2018 or 09/01/2018.

Units of measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using the International System of Units (SI).

Preparation of figures

Upon submission of an article, authors should include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the manuscript in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within two to three days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication.

Copyright and permissions

Authors retain the copyright of their manuscripts, and all Open Access articles are distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations. The submitting author is responsible for securing any permissions needed for the reuse of copyrighted materials included in the manuscript.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Reporting guidelines

Authors are strongly encouraged to use appropriate reporting guidelines when preparing and submitting manuscripts, to maximise transparency and reproducibility. Our editors and reviewers are also encouraged to use them in the review process. Completed checklists should be provided in the supplementary files on submission. We particularly encourage the use of:

[CONSORT](#) for randomized controlled trials

[TREND](#) for non-randomized trials

[PRISMA](#) for systematic review and meta-analyses

[CARE](#) for case reports

[STROBE](#) for observational studies

[STREGA](#) for genetic association studies

[SRQR](#) for qualitative studies

[STARD](#) for diagnostic accuracy studies

[ARRIVE](#) for animal experiments

Conflicts of interest

Conflicts of interest (COIs, also known as ‘competing interests’) occur when issues outside research could be reasonably perceived to affect the neutrality or objectivity

of the work or its assessment. For more information, see our publication ethics policy. Authors must declare all potential interests – whether or not they actually had an influence – in a ‘Conflicts of Interest’ section, which should explain why the interest may be a conflict. If there are none, the authors should state “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.” Submitting authors are responsible for coauthors declaring their interests. Declared conflicts of interest will be considered by the editor and reviewers and included in the published article.

Authors must declare current or recent funding (including for Article Processing Charges) and other payments, goods or services that might influence the work. All funding, whether a conflict or not, must be declared in the “Funding Statement”. The involvement of anyone other than the authors who 1) has an interest in the outcome of the work; 2) is affiliated to an organization with such an interest; or 3) was employed or paid by a funder, in the commissioning, conception, planning, design, conduct, or analysis of the work, the preparation or editing of the manuscript, or the decision to publish must be declared. You may be asked to make certain changes to your manuscript as a result of your declaration. These requests are not an accusation of impropriety. The Editor or reviewer is helping you to protect your work against potential criticisms. If you are in any doubt about declaring a potential conflict, remember that if it is revealed later – especially after publication – it could cause more problems than simply declaring it at the time of submission. Undeclared conflicts of interest could lead to a corrigendum or, in the most serious cases, a retraction.

Microarray data submission

Before publication, the microarray data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Small molecule single crystal X-ray diffraction data

We recommend the use of SHELXL (2014 or later) for data processing, which embeds both the results file and structure factors into the finalized crystallographic information file (CIF) (see <http://journals.iucr.org/c/services/shelxl.html> for more information).

We strongly encourage that all new small molecule single crystal X-ray diffraction data be deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC; <https://www.ccdc.cam.ac.uk/deposit>) prior to submission of your article. The CCDC number(s) assigned to your structure(s) should be listed in the “Data Availability” statement, which permits retrieval of the crystallographic data for peer review purposes, and allows readers to find them once the article is published.

We would also ask you to check the integrity of your data using the IUCr's checkCIF service (available here: <http://checkcif.iucr.org/>), and address significant unresolved problems (typically all A- and B-alerts) in the Validation Response Form portion of the CIF. The generation of the checkCIF report and the response to A- and B-alerts can also all be done through the deposition to the CCDC.

If you choose to not deposit your data in the CCDC prior to submission, you must upload your CIF (and RES and HKL/FCF files if necessary), along with a PDF of the checkCIF report (link above) as Supporting Information, at the same as uploading your manuscript. At acceptance, you should then submit your crystal data to an appropriate repository, and update the "Data Availability" statement in your manuscript to indicate how authors can retrieve the data.

The Data Availability section should reference crystallographic data in the following format:

"Crystallographic data for the structures reported in this manuscript have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre under the CCDC numbers: xxxxxx (Compound name 1), xxxxxx (Compound name 2), and xxxxxx (Compound name 3). Copies of these data can be obtained free of charge from http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif."

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing manuscripts which describe a new zoological taxon name, Hindawi aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). Therefore, for all manuscripts that include the naming of a new zoological taxon, authors are requested to contact Zoobank, the online registration system for the International Commission on Zoological Nomenclature, to obtain a Life Science Identifier (LSID). Moreover, authors are requested to insert the following text in the "Materials and Methods" section, in a subsection to be called "Nomenclatural Acts":

The new names contained in this article are available under the International Code of Zoological Nomenclature. This work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank. Zoobank Life Science Identifier (LSID) for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The LSID registration and any associated information can be viewed in a web browser by adding the LSID to the prefix "<http://zoobank.org/>."

Ethical guidelines

In any studies on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Manuscripts describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects' understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure

used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.

Appeals

Authors may appeal if they feel that the decision to reject was based on: i) a major misunderstanding over a technical aspect of the manuscript, or ii) a failure understand the scientific advance shown by the manuscript. Appeals requesting a second opinion without sufficient justification will not be considered. To lodge an appeal, please contact the journal by email, quoting your manuscript number. Appeals will only be considered from the original submitting author.x, .rtf).