

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
AQUOSO DE *Phoenix roebelinii* O'Brien

ROGÉRIO ZUCOLOTTO

VILHA VELHA
MARÇO/2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
AQUOSO DE *Phoenix roebelinii* O'Brien

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ROGÉRIO ZUCOLOTTO

VILHA VELHA
MARÇO/2013

Catlogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

Z94c Zucolotto, Rogério.

Citotoxicidade e atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Phoenix roebelinii* O'Brien / Rogério Zucolotto. – 2013.
41 f. : il.

Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Arecaceae – Uso terapêutico. 2. Microorganismos – Efeito dos antibióticos. 3. Matéria médica vegetal. I. Lessa, Fernanda Campos Rosetti. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.53

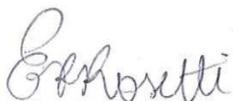
ROGÉRIO ZUCOLOTTO

**CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
AQUOSO DE *Phoenix roebelinii* O'Brien**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a
obtenção do grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de março de 2013,

Banca Examinadora:



Elizabeth Pimentel Rosetti - UFES



Dominik Lenz- UVV



**Prof.ª Dr.ª Fernanda Campos Rosetti Lessa- UVV
Orientador**

Dedico a Núbia Miller pelo esmero e apoio constante durante toda a jornada;

A Helen que está por vir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande criador, que permitiu e inspirou a elaboração desta co-criação;

À professora Dr.^a Fernanda Campos Rosetti Lessa pelo direcionamento, orientação e saber científico na elaboração do trabalho;

À professora Dr.^a. Denise Coutinho Endringer pelos préstimos e sugestões;

Aos nossos professores que tanto contribuíram para a edificação desta obra agregando valores à nossa vida;

Ao professor M.Sc. João Damasceno Lopes Martins pela disposição e contribuição na realização dos ensaios microbiológicos;

Ao colega Paulo pelas orientações no laboratório de Microbiologia;

À Miriam, colega de mestrado, pela ajuda e dedicação em todos os momentos e em especial nos experimentos do laboratório de Cultura de Células;

À Suellen, colega de mestrado, pela disposição e apoio;

Ao amigo Bruno pela companhia de estudos e viagens incansáveis;

À Gisele pelas contribuições gramaticais e *abstract*;

Aos colegas de mestrado - Silas, Girlandia, Pablo, Ewelyne e Andrews - pelas considerações nas minhas indagações;

À Marcelina, irmã e amiga, pela carinhosa hospedagem;

À bibliotecária Elisângela pela atenção nas buscas dos artigos;

Às amigas M.Sc. Tânia e M.Sc. Vanusa presentes na caminhada até aqui;

À Universidade Vila Velha pela oportunidade do caminho concedido que tanto contribuiu para o crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 ARTIGO DE PUBLICAÇÃO	13
2.1 Introdução	18
2.2 Material e Métodos	19
2.3 Resultados	23
2.4 Discussão	24
2.5 Conclusão	28
2.6 Agradecimentos	28
2.7 Referências	29
3 REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Efeito antimicrobiano após tratamento com extratos de palmeira <i>Phoenix</i> .	36
Figura 02	Curva de IC ₅₀ MCF-7 para PF folíolos.	36
Figura 03	Curva de IC ₅₀ MCF-7 para PF caule.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Substâncias identificadas por comparação do tempo de retenção e o espectro com as soluções padrões.	37
Tabela 02	Composição química (LC/MS/MS) dos extratos de <i>Phoenix roebelenii</i> O'Brien.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Ágar infusão de cérebro e coração
°C	Grau Celsius
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FS	Fração de sobrevivência
HEP	Hepatoma
HCl	Ácido clorídrico
IC ₅₀	Concentração inibitória
MG	Miligrama
ML	Mililitro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
M	Molar ou Mol/L
µL	Microlitro
µM	Mícron ou micrômetro
NM	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
PA	Padrão analítico
RPMI	Meio desenvolvido pelo Instituto Memorial Park Roswell
®	Marca registrada
SDH	Desidrogenase Succínica
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

RESUMO

ZUCOLOTTO, Rogério, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, março de 2013. **CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO DE *Phoenix roebelinii* O'Brien**. Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa. Co-orientadora: Denise Coutinho Endringer.

Notável desafio ao tratamento de doenças orais é a resistência de microrganismos aos antibióticos. A produção de fitomedicamentos torna-se necessária e atrativa, tendo em vista a produção de novos princípios ativos. A palmeira *Phoenix*, planta da família *Arecaceae*, é amplamente utilizada na medicina popular. Estudos para avaliar a atividade antimicrobiana oral e a ação citotóxica desse agente natural tornam-se importantes e promissores ao oferecer novas possibilidades terapêuticas. Realizou-se a identificação do extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. As concentrações utilizadas foram diluídas em placa de 96 poços (400 μ L/mL) em frações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mg/mL. O extrato foi testado sobre os micro-organismos *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* e sua citotoxicidade avaliada nas células MDPC-23 (odontoblástica), HEP-1C1C7 (tumoraes de hepatoma murino) e MCF-7 (carcinoma de mama). Para isso utilizou-se o método colorimétrico do metiltetrazolium. Os valores finais obtidos foram submetidos à análise estatística empregando-se o test-t e Tukey. Os componentes encontrados no extrato da *Phoenix roebelinii* O'Brien foram o ácido gálico, o ácido clorogênico e quercetina. Houve inibição do crescimento sobre todos os micro-organismos testados. As concentrações dos extratos aquosos a partir do folíolo e do caule inibiram as células de forma concentração dependente, apresentando ambos a $IC_{50} = 278,5 \pm 16,71 \mu\text{g/mL}$. O extrato de folíolo de Palmeira *phoenix*, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, não foi considerado citotóxico frente à células odontoblastoides MDPC-23 (14,3 \pm 6,7% de inibição do crescimento) bem como para as célula carcinoma de mama MCF-7 (16,71 $\mu\text{g/mL}$). Nesta mesma concentração o extrato apresentou baixa citotoxicidade sobre as células hepatoma murino HEP-1C1C7 (21,7 \pm 12,5% de inibição do crescimento). Esses resultados indicam a possibilidade de que o extrato aquoso de palmeira *Phoenix* e seus constituintes podem encontrar aplicação como agente antibacteriano e de um possível efeito quimiopreventivo.

Palavras-chave: fitoterápico, micro-organismos orais, efeito citotóxico.

ABSTRACT

ZUCOLOTTO, Rogerio, M. Sc., University of Vila Velha - ES, march, 2013. **Antimicrobial activity and cytotoxicity of extract aqueou of *Phoenix roebelinii* O'Brien**. Professor for guidance: Fernanda Campos Rosetti Lessa. Professor co-advisor: Denise Coutinho Endringer.

Remarkable challenge of treatment of oral diseases is the microorganisms antibiotics resistance. The production of phytomedicines becomes necessary and attractive considering the production of new active principles. The *Phoenix* palm, *Arecaceae* plant family, is widely used in popular medicine. Studies to evaluate the antimicrobial oral activity and the cytotoxic action of this natural agent becomes important and promising offering new therapeutically possibilities. We performed the identification of aqueous extract through liquid chromatography coupled with mass spectrometric. The concentrations used were diluted on 96-well plate format (400 μ L/mL) in fractions of 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mg/mL. The extract was tested over microorganisms *Bacillus sp.*, *Enterococcus faecalis*, and *Streptococcus mutans* and their cytotoxicity were evaluated in cell MDPC-23 (odontoblast), HEP-1C1C7 (murine hepatoma) e MCF-7 (breast cancer). To do this, we used the metiltetrazolium colorimetric method. The final values obtained were submitted to statistical analysis employing the test-t and Tukey. The components found in *Phoenix roebelinii* O'Brien extract were the gallic acid, the chlorogenic acid, and quercetin. There was growth inhibition over all tested microorganism. The concentrations of aqueous extracts from leaflet and stalk inhibited the cells by dependent concentration, showing both IC₅₀= 278,5 \pm 16,71 μ g/mL. The Palm *phoenix* leaflet extract, in concentration of 1000 μ g/mL, was not considered cytotoxic with the odontoblast MDPC-23 cells (14,3 \pm 6,7% of growth inhibition) as well as breast carcinoma MCF-7 cells (16,71 μ g/mL). In this same concentration the extract shows low cytotoxic over murine hepatoma HEP-1C1C7 cells (21,7 \pm 12,5% of growth inhibition). These results indicate the possibility that the palm *Phoenix* aqueous extract and their constituents can find an application as antibacterial agent and of a possible chemopreventive effect.

Keywords: herbal medicine, oral microorganisms, cytotoxic effect.

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies vegetais medicinais são consideradas um dos meios mais antigos empregados pelo homem para o tratamento de todos os tipos de enfermidades (OLIVEIRA & ARAÚJO, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) e igualmente a ANVISA reconhecem o uso de plantas medicinais como fonte terapêutica segura, desde que se realizem os ensaios químicos e farmacológicos de cada espécie em uso. Recentemente, o Ministério da Saúde tem apoiado pesquisas nessa área, visando avaliar as espécies vegetais utilizadas pela população, a fim de desenvolver medicamentos, como terapia alternativa e/ou complementar (BRASIL, 2004; FEITOSA et al., 2004).

Diversos trabalhos foram publicados, sinalizando os potenciais efeitos toxicológicos que esses produtos podem representar (Park et al., 2004; Marcus & Snodgrass, 2005). O equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um composto é um requisito importante, quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000).

A citotoxicidade é o conjunto de alterações na homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas (NARDONE, 1977). Assim, testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002).

Os ensaios de citotoxicidade podem ser desenvolvidos em várias metodologias: contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos (HENRIKSSON *et al.*, 2006). Dentre os ensaios colorimétricos, destaca-se o MTT: (sais de tetrazolio), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Consiste no ensaio de proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazólio a cristais púrpuros de formazana, usando uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica. O ensaio detecta células metabolicamente ativas e a leitura é feita em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). A absorbância é determinada a 540 ou 570nm em leitor de ELISA.

As plantas têm sido fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (SIMÕES et al., 2004). Dentre as plantas com potencial medicinal destaca-se a palmeira *Phoenix* que é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de muitas doenças como distúrbios de memória, febre, inflamação, paralisia, perda de consciência, distúrbios do sistema nervoso (NADKARNI, 1975).

A *Phoenix roebelinii* O'Brien, planta da família *Arecaceae*, é originária das regiões do norte do Laos e do Vietnã e áreas do Yunnan, no sudoeste da China (IOSSI et al., 2003). A espécie é popularmente conhecida pelo nome de tamareira-anã e palmeira fênix, podendo atingir de 2 a 4 metros de altura, sendo utilizada na ornamentação de vasos, parques e jardins (Iossi et al., 2003). Trata-se de uma espécie de palmeira com grande valor ornamental e amplamente cultivada nos trópicos, nas regiões subtropicais e temperada amena (IOSSI et al., 2007). No Brasil sua comercialização ainda é muito restrita, embora em alguns países tal comércio seja mais difundido (IOSSI et al., 2007). Não foram encontrados dados da constituição química da *Phoenix roebelinii* O'Brien, porém outras espécies do gênero *Phoenix* têm sido pesquisadas, sendo isolados diversos polissacarídeos, em particular das sementes (ISHURD et al., 2003) e frutas da *Phoenix dactylifera* (ISHURD et al., 2002).

Outras espécies do gênero *Phoenix* apresentaram ser rico em tanino (VAN VUUREN et al., 2009), que possui normalmente ação antimicrobiana frente aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter* e *Staphylococcus*, além de inibir o crescimento de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Betrytis*, *Candida* e *Trichoderma* (OLIVEIRA et al., 2006). O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses: 1) pressupõe-se que os taninos inibam enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; 2) inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo; 3) fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade daqueles que são essenciais para o metabolismo microbiano (LOGUERCIO et al., 2005).

Polissacarídeos, como as hemiceluloses, foram encontradas na *Phoenix dactylifera*. A hemicelulose, um carboidrato insolúvel, é constituída de vários tipos de unidades de açúcares como manose, arabinose, galactose e glicose (ISHURD et al., 2003).

Estudos *in vitro* realizados por Vayalil (2002) mostraram que o extrato aquoso do fruto da palmeira é um potente eliminador de radicais superóxido e hidroxila, além de ser inibidor da peroxidação lipídica induzida pelo ferro e a oxidação de proteína no cérebro homogeneizado de rato de forma concentração dependente. A atividade antioxidante observada foi atribuída à presença dos compostos fenólicos, antocianinas, flavonóides glicosilados e procianidinas (ABDUL & ALLAITH, 2008; AL FARSI et al., 2005).

Segundo Al-Daihan & Bhat, (2012), os extratos de frutas, folhas, sementes e cascas da tamareira mostram atividade antibacteriana. Os extratos das frutas e folhas revelaram melhor atividade que os extratos das sementes e cascas. Elevada atividade contra *Staphylococcus aureus* foi observada nos extratos de acetona a partir da fruta. O extrato metanólico da folha apresentou maior atividade contra *Escherichia coli*.

A análise da atividade antimicrobiana de extratos de plantas é uma ferramenta importante na busca de novos compostos com potencial aplicação terapêutica. Há a necessidade contínua para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, pois o aumento do número de bactérias resistentes aos medicamentos já não é acompanhado por descobertas de novas drogas para o tratamento de infecções (WHITMAN, 2008).

Baseado no exposto, pode-se afirmar que estudos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Phoenix roebelinii* O'Brien frente a microrganismos orais, assim como a ação citotóxica desse agente natural, tornam-se importantes e promissores ao oferecer nova possibilidade terapêutica baseada na fitoterapia.

Esse estudo objetiva avaliar o efeito citotóxico e a atividade antimicrobiana de extrato *Phoenix roebelinii* O'Brien.

2 ARTIGO DE PUBLICAÇÃO

Citotoxicidade e Atividade Antimicrobiana do extrato aquoso de *Phoenix roebelinii* O'brien

Rogério Zucolotto¹, Mirian de A. Silva¹, João D. L. Martins¹, Rodrigo Scherer¹, Carlos A. de S. Costa², Denise C. Endringer¹ e Fernanda C. R. Lessa^{1*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Vila Velha-ES, Brasil

²Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, Brasil

*Autor para correspondência

Autor correspondente:

Fernanda Campos Rosetti Lessa, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, CEP 29102-770, Vila Velha, ES, Brasil.

Telefax: 55-27- 3421-2001 E-mail: fcrlessa@yahoo.com.br

Resumo

ZUCOLOTTO, Rogério, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, março de 2013. **CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO DE *Phoenix roebelinii* O'Brien**. Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa. Co-orientadora: Denise Coutinho Endringer.

Notável desafio ao tratamento de doenças orais é a resistência de micro-organismos aos antibióticos. A produção de fitomedicamentos torna-se promissora, tendo em vista novos princípios ativos. A palmeira *Phoenix (Arecaceae)* é amplamente utilizada na medicina popular. Estudos para avaliar a atividade antimicrobiana oral e a ação citotóxica desse agente são importantes ao oferecer novas possibilidades terapêuticas. Realizou-se a identificação do extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. As concentrações do extrato foram em frações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mg/mL, sendo testadas sobre *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* e a citotoxicidade avaliada nas células MDPC-23 (odontoblástica), HEP-1C1C7 (tumores de hepatoma murino) e MCF-7 (carcinoma de mama). Utilizou-se o método colorimétrico do metiltetrazolium. Os valores foram submetidos à análise estatística com test-t e Tukey. Os componentes encontrados na *Phoenix roebelinii* O'Brien foram quercetina, ácidos gálico e clorogênico. Houve inibição do crescimento sobre os micro-organismos testados. As concentrações dos extratos aquosos do folíolo e do caule inibiram as células de forma concentração dependente, apresentando ambos $IC_{50} = 278,5 \pm 16,71 \mu\text{g/mL}$. O extrato de folíolo, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, não foi considerado citotóxico frente às células MDPC-23 (14,3 \pm 6,7% de inibição do crescimento) e MCF-7 (16,71 $\mu\text{g/mL}$). Nesta mesma concentração o extrato apresentou baixa citotoxicidade sobre as células HEP-1C1C7 (21,7 \pm 12,5% de inibição do crescimento). Esses resultados indicam que extrato aquoso da palmeira *Phoenix* e seus constituintes podem ter aplicação como agente antibacteriano e ter um possível efeito quimiopreventivo.

Unitermos: fitoterápico, micro-organismos orais, efeito citotóxico.

Abstract

ZUCOLOTTO, Rogerio, M. Sc., University of Vila Velha - ES, march, 2013. **Antimicrobial activity and cytotoxicity of extract aqueou of *Phoenix roebelinii* O'Brien**. Professor for guidance: Fernanda Campos Rosetti Lessa. Professor co-advisor: Denise Coutinho Endringer.

Remarkable challenge of treatment of oral diseases is the microorganisms antibiotics resistance. The production of phytomedicines becomes promising, considering new active principles. The Phoenix palm (Arecaceae) is widely used in popular medicine. Studies to evaluate the antimicrobial oral activity and the cytotoxic action of this natural agent are important offering new therapeutically possibilities. We performed the identification of aqueous extract through liquid chromatography coupled with mass spectrometric. The extract concentrations were in fractions of 2,0; 1,0; 0,5, and 0,25 mg/mL, being tested over *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis*, and *Streptococcus mutans* and the cytotoxicity evaluated in cells MDPC-23 (odontoblast), HEP-1C1C7 (murine hepatoma), and MCF-7 (breast cancer). We used the metiltetrazolium colorimetric method. The values obtained were submitted to statistical analysis employing the test-t and Tukey. The components found in *Phoenix roebelinii* O'Brien were quercetin, gallic acid, and chlorogenic acid. There was growth inhibition over microorganisms tested. The concentrations of aqueous extracts of leaflet and stalk inhibited the cells by dependent concentration, showing both $IC_{50} = 278,5 \pm 16,71 \mu\text{g/mL}$. The leaflet extract, in concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$, was not considered cytotoxic with the cells MDPC-23 (14,3 \pm 6,7% of growth inhibition) and MCF-7 (16,71 $\mu\text{g/mL}$). In this same concentration the extract shows low cytotoxic over HEP-1C1C7 cells (21,7 \pm 12,5% of growth inhibition). These results indicate that the palm *Phoenix* and their constituents can find an application as antibacterial agent and of a possible chemopreventive effect.

Keywords: herbal medicine, oral microorganisms, cytotoxic effect.

2.1 Introdução

Pesquisas sobre atividade antimicrobiana, modo de ação e uso potencial dos óleos essenciais de plantas tem ganhado importância para produção de novos fármacos. Segundo Novais et al. (2003), os vegetais são uma excelente fonte de novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular de produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química.

Ainda pouco se sabe sobre a eficácia de plantas medicinais empregadas em formulação para tratamentos de doenças orais. Com a finalidade de auxiliar no tratamento dessas enfermidades muitos agentes químicos com ação antimicrobiana vêm sendo estudados, mas a eficácia de plantas com essa finalidade ainda são bem raros, havendo a necessidade de intensificar os estudos de plantas que tenham efeito antimicrobiano em microrganismos orais (Nascimento et al., 2000). Um grande desafio ao tratamento de doenças orais é a resistência de certos microrganismos a diversos antibióticos, por exemplo, o *Enterococcus faecalis*, justificando a importância de estudos que possam contribuir com novos antimicrobianos alternativos que sejam eficazes (Paradella et al., 2007; Pereira et al., 2008).

As espécies vegetais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos empregados na terapia moderna (Fabricant & Farnsworth, 2001; Newman et al., 2003; Butler, 2005; Ella et al., 2007). Comprovando a importância da pesquisa por agentes ativos, a partir de fontes naturais, no período de 1981 a 2006, 1010 novos fármacos foram aprovados para uso nos EUA pelo FDA (*Food and Drug Administration*), desses 28,3% são produtos naturais ou derivados e 10,7% produtos sintéticos miméticos de produtos naturais (Newman & Cragg, 2007).

A produção de fitomedicamentos a partir de plantas cultivadas torna-se necessária e atrativa tendo em vista a produção dos princípios ativos de interesse. A *Phoenix roebelinii* O'Brien, planta da família *Arecaceae*, popularmente conhecida pelo nome de tamareira-anã e

palmeira fênix, utilizada na ornamentação de vasos, parques e jardins (Iossi et al., 2003) é uma espécie de palmeira com grande valor ornamental e amplamente cultivada nos trópicos, nas regiões subtropicais e temperadas amenas (Iossi et al., 2007). Não foram encontrados dados da constituição química da *Phoenix roebelinii* O'Brien, porém outras espécies do gênero *Phoenix* têm sido pesquisadas (Ishurd et al., 2002; Ishurd et al., 2003).

O interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a fitoterapia e para que posteriormente possa ser proposta uma utilização do extrato de *Phoenix roebelinii* O'Brien em animais torna-se fundamental realizar também testes citotóxicos.

Baseado no exposto pode-se afirmar que estudos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Phoenix roebelinii* O'Brien frente a microrganismos orais, assim como a ação citotóxica desse agente natural, tornam-se importantes e promissores para que possa ser oferecida uma nova possibilidade terapêutica baseada em fitoterápicos.

Esse estudo objetiva avaliar o efeito citotóxico e a atividade antimicrobiana de extrato *Phoenix roebelinii* O'Brien.

2.2 Material e Métodos

Material vegetal

Foram coletados folhas e caule da espécie *Phoenix roebelenii* O'Brien. Inicialmente, realizou-se a triagem do material coletado, e submetido à secagem em estufa ventilada, a 40°C, por 72 h. Este material foi armazenado em freezer -20 °C, no laboratório de Obtenção e Análise de Produtos Naturais da UVV, e foi empregado nesta pesquisa.

Obtenção do extrato aquoso de *Phoenix roebelenii* O'Brien

O preparo das amostras (do extrato aquoso de folíolos e de caule - *Phoenix roebelenii* O'Brien) para utilização *in vitro* foi realizado no laboratório de Biologia Molecular

e Cultura de Células, Biopráticas - Universidade Vila Velha. Para os ensaios *in vitro*, as amostras foram solubilizadas em DMSO, na concentração de 4,0 mg/mL, constituindo esta a solução estoque. Essa solução foi mantida a -20 °C até o momento de uso, sendo então diluída em placa de 96 poços (400µL/mL) em frações de 2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL.

Identificação dos extratos por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS).

Foi empregado cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas (HPLC Agilent 1200 equipado com API 3200 - Applied Biosystems) com triplo quadrupolo para as análises. Todas as separações foram realizadas em uma coluna Agilent Eclipse C18 (150 mm x 4,6 mm, 5mm) a 35 °C. A fase móvel foi composta por (A) solução aquosa de ácido fórmico (0,05%, v/v) e (B) acetonitrila (0,3 mL/min) usando uma eluição em gradiente de 10-60% de B em 0-8 min, 60-90% de B 8-12 min, 90-10% B por 12-15 min e o tempo de reequilíbrio foi de 6 min. A pressão de nebulizador do MS foi de 50 psi. A temperatura do gás foi de 650°C e voltagem capilar foi de 5500 V.

A identificação dos constituintes químicos das amostras por LC/MS/MS foi realizada conforme descrito por Zhu et al., (2012), com modificações. Resumidamente, as amostras foram diluídas em metanol grau HPLC (Sigma Alrich, St Louis; 1 mg/mL) e filtradas. As substâncias foram identificadas por comparação do tempo de retenção e o espectro com as soluções padrões. A quantificação foi realizada por curva externa com 7 pontos, para as substâncias padrão x,y,z (faixa de concentração). Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo ruído de sinal, 3 e 5 vezes, respectivamente (Tabela-01).

Ensaio Microbiológico

O extrato aquoso de palmeira *Phoenix* foi testado sobre os micro-organismos *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis* ATCC n° 10231 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175; adquiridos no Laboratório de Microbiologia do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha. Foram cultivados em placa de Petri contendo o meio BHI-Agar (Himedia®) em capela de fluxo laminar para evitar contaminações das colônias. Em seguida os micro-organismos foram incubados em estufa a 37°C durante 48 horas.

Para a obtenção de um inóculo 10^8 UFC/mL do microrganismo, depois de incubado por 48 h, o mesmo foi capturado da placa de Petri com o auxílio de uma haste metálica esterilizada e, diluído inicialmente em salina. Três alíquotas de 100 µL do microrganismo diluído em salina foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo chato para determinar a concentração exata do inóculo, levado para leitura de absorbância em leitor de ELISA. Em seguida, o micro-organismo foi diluído em meio B.H.I. – Ágar e 100 µL do inóculo foram semeados na placa de 96 poços e incubados a 37°C em estufa durante 24 horas.

Após esse período, foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações dos extratos à placa, sendo incubados por mais 12 horas. No grupo controle positivo foram adicionados apenas 100 µL do inóculo adicionados mais 100 µL de BHI-Agar e no grupo controle negativo foram adicionados 100 µL de hipoclorito de sódio 3%.

Após o tempo de 72 horas de exposição dos micro-organismos às diferentes concentrações do extrato aquoso de Palmeira *Phoenix* e às soluções controles, adicionou-se uma solução contendo 25 µL de MTT (5mg/mL). Após 4 horas de incubação, adicionou-se 50 µL de uma solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04M. A atividade antimicrobiana foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570nm em leitor de ELISA (Leitora Automática De Microplacas de 96 Poços - Mod. Tp Reader –ThermoPlate).

Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos à análise estatística.

Ensaio de Citotoxicidade

Linagem de células tumoral de hepatoma murino Hepa-1c1c7, odontoblástica MDPC- 23 e de carcinoma de mama MCF-7 foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas, SP), 100 IU/mL e 100µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo CO₂ a 5% e na temperatura de 37°C.

As diferentes concentrações do extrato aquoso de Palmeira Phoenix foram preparadas diluindo-as em meio de cultura DMEM completo. O meio de cultura DMEM puro foi utilizado como controle negativo, sendo que a solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 3% foi empregada como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata.

As células (30.000 células/cm²) foram cultivadas em placas de acrílico esterilizadas com 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, na temperatura de 37°C e pelo período de 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e um volume de 10µL das diferentes concentrações do extrato de Palmeira Phoenix e as soluções controles foi introduzido em cada compartimento, sendo então mantidas em incubadora pelo período de 48 horas.

A atividade metabólica celular foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do metiltetrazólio (MTT assay), por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), que representa taxa de respiração mitocondrial das células (Mosmann, 1983). O MTT é um sal hidrossolúvel de cor amarela, que é reduzido por células vivas em formazana, de cor violeta e insolúvel numa solução aquosa. Este teste mede a atividade da

enzima desidrogenase succínica (SDH) presente nas mitocôndrias das células viáveis, que convertem o sal de MTT via agentes celulares redutores, para formazana que se deposita na célula. A quantidade formada de formazana é proporcional à atividade enzimática mensurada após sua diluição. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Leitora Automática De Microplacas de 96 Poços - Mod. Tp Reader –ThermoPlate). Para a padronização da leitura, os dois compartimentos iniciais dos recipientes foram preenchidos com 100 µL da solução de isopropanol acidificado, para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular.

Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos à análise estatística. Em seguida, calculou-se, em porcentagem, o efeito inibitório dos diferentes grupos estudados sobre a atividade mitocondrial das células.

Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise estatística empregando-se o teste de Tukey (*Statistical Package Social Science* versão 11.5 - SPSS 11.5 e Prism 3.0-Graph Pad Software, Inc., USA). A significância estatística para os valores médios de porcentagem de inibição dos extratos foram determinados pelo test-*t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

2.3 Resultados

A análise de Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS) testou as seguintes substâncias: Ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarinico, apigenina e quercetina. Foi revelada a presença de três compostos, sendo o ácido gálico o de maior ocorrência (144,32±1,93 µg/mL) seguido do ácido clorogênico

(29,77±0,02 µg/mL) e quercetina (5,05 µg/mL). O ácido gálico foi encontrado na folha e caule e a quercetina somente nas folhas, conforme descrito na Tabela 02.

Atividade antimicrobiana

Os resultados deste trabalho demonstraram a atividade antimicrobiana após o tratamento com extratos da *Phoenix roebelenii* O'Brien sobre *Streptococcus mutans* (SM), *Bacillus* sp. (Ba) e *Enterococcus faecalis* (EC) (Figura 01).

A inibição do crescimento de *S.mutans* apresentou-se progressiva, de acordo com o grau de concentração do extrato aquoso da planta em estudo. Houve aumento proporcional das inibições do crescimento à medida que a concentração do extrato aumentava.

Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados foram expressos na concentração que inibe 50% do crescimento do controle, após o período de incubação (IC₅₀). Os valores foram estimados a partir de um gráfico de log₁₀ da concentração dos extratos da palmeira *Phoenix* em µg/mL versus a percentagem de células inibidas. Os resultados mostraram que as concentrações dos extratos aquosos a partir do folíolo (Figura 02) e do caule (Figura 03) inibiram a célula de forma concentração-dependente, apresentando ambos a IC₅₀=278,5± 16,71 µg/mL, ou seja, a percentagem de inibição de crescimento aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração do extrato.

2.4 Discussão

Nas últimas décadas, numerosas publicações têm descrito a grande importância que os produtos naturais possuem no desenvolvimento de novos fármacos (Gilani & Rahman, 2005; Patwardhan, 2005).

Numerosas plantas e seus metabólitos secundários isolados são relatados com propriedades antimicrobianas (Ali & Qaiser, 2009; Qadrie et al., 2009; Nisar et al., 2010; Khan et al., 2011; Samiullah et al., 2011). Perveen et al., (2011) descreveram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas e caroços de três variedade de *Phoenix dactylifera* frente a sete espécies de micro-organismos, sendo que os extratos metanólico e de acetona mostraram boa atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, e o mesmo não pôde ser observado sobre o *Enterococcus faecalis*. No entanto, o extrato aquoso apresentou pouco efeito sobre todas as espécies bacterianas testadas.

Os fitoquímicos derivados da raiz, caule, folhas, frutos, flores e sementes de plantas medicinais incluem compostos fenólicos, óleos essenciais, proteínas e antioxidantes, juntos, eles trabalham como agentes de biocontrole (Cragg et al., 1996). O potencial de inibição de extratos de plantas contra o crescimento de micro-organismos foi atribuída à presença de antioxidantes (Cutter, 2000; Puupponen et al., 2001). Tem sido relatado que todas as partes da palmeira, incluindo sementes e folhas, contêm hidratos de carbono, alcalóides, esteróides, vitaminas, flavonóides e taninos. O perfil fenólico da planta revelou a presença de ácidos, principalmente, o cinâmico, glicósidos de flavonóides, flavonóides, quatro ácidos fenólicos livres e nove ácidos fenólicos ligados (Dowson, 1982; Mosa et al., 1986; Ziouti et al., 1996; Eong, 2006; Biglari et al., 2008).

Os óleos essenciais podem apresentar atividade citotóxica, geralmente sem serem mutagênicos, em vários organismos (Bakkali et al., 2008; Stamatou et al., 1999). Uma vez que a citotoxicidade diferencial é também uma característica útil para potenciais agentes antitumorais, a atividade citotóxica do extrato de palmeira *Phoenix* foi avaliada em linhagem de células tumorais de hepatoma, odontoblástica e de carcinoma de mama por ensaio MTT baseado na viabilidade celular.

A inibição do crescimento para a linhagem carcinoma de mama MCF-7 foi concentração-dependente, no entanto a concentração inibitória média (IC₅₀) foi maior que 1000 µg/mL sendo considerado de baixa citotoxicidade (figura 03).

Na concentração de 1000 µg/mL, o extrato de folíolo de Palmeira fênix não foi considerado citotóxico frente à linhagem de células odontoblastóides MDPC-23 (14,3±6,7% de inibição do crescimento). As células odontoblastóides MDPC-23 representam uma das linhagens celulares mais apropriadas para avaliação dos efeitos citotóxicos de diferentes produtos utilizados na odontologia (Macdougall et al., 1995).

Na concentração de 1000 µg/mL, o extrato de folíolo de Palmeira fênix apresentou baixa citotoxicidade frente à linhagem celular de hepatoma murino HEP-1C1C7 (21,7±12,5% de inibição do crescimento), não sendo possível calcular sua IC₅₀.

O extrato aquoso não apresentou potencial antitumoral por expressar baixa citotoxicidade. O Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera forte atividade antineoplásica, valores de IC₅₀ menor ou igual a 4,0 µg/mL (Suffness & Pezzuto, 1991). A baixa atividade citotóxica dos extratos de palmeira *Phoenix*, observada nas linhagens testadas, encontra um paralelo com trabalhos que relataram que o flavonóide quercetina demonstrou ser inativa em linhagem de células da nasofaringe (KB) (IC₅₀ = 295,8µM) (delRayo-Camacho et al., 2002).

Não foram encontrados na literatura, dados da constituição química da *Phoenix roebelenii* O'Brien, porém outras espécies do gênero têm sido pesquisados, sendo isolados diversos polissacarídeos, em particular das sementes (Ishurd et al., 2003) e frutas da *Phoenix dactylifera* (Ishurd et al., 2002). Estudos demonstraram a presença de importantes compostos químicos como ácidos cinâmicos, glicosídeos e flavonóides na palmeira *Phoenix* (Seelig, 1974; Biglari, 2008).

A análise de Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS) revelou a presença do ácido gálico (AG) em maior quantidade (144,32±1,93

µg/mL). Estudos recentes demonstraram que o ácido gálico apresenta várias propriedades terapêuticas, incluindo atividades antidiarreicas (Namkung et al., 2010), antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e antineoplásica (Fiuza et al., 2004; Sameermahmood et al., 2010), podendo ser responsável pelo efeito antimicrobiano encontrado no estudo.

Por outro lado, a ação citotóxica do AG foi comprovada em várias linhagens tumoral e em fibroblastos renais – morfofisiologicamente análogos às células estreladas hepáticas (CEH), porém o mesmo não foi observado quando administrado em outras linhagens celulares normais como queratinócitos, células endoteliais e hepatócitos, demonstrando nenhuma ou muito baixa atividade citotóxica (Phan et al., 2003; Chuang et al., 2010). Além de não ser citotóxico aos hepatócitos, foi atribuído ao AG importante papel de proteção hepatocelular (Hsu & Yen, 2007).

O ácido clorogênico (CGA) em concentrações específicas mostrou ser eficaz na destruição das células cancerosas do pulmão, sem afetar fibroblastos normais, apoiando descobertas anteriores de que o CGA deva também ser investigado como agente anticancerígeno (Morón et al., 2012).

Dentre os compostos fenólicos com potencial terapêutico, destaca-se o 3,4,5-acido trihidroxibenzóico, ou ácido gálico (AG), que é encontrado amplamente distribuído em plantas. O AG pode ser detectado como molécula livre ou como um dos componentes químico de outros ativos fenólicos, como os taninos (Hemingway et al., 1999). O AG e seus derivados também estão presentes em cascas de carvalho, uvas e folhas de chá como um dos principais componentes fenólicos (Ow & Stupans, 2003). Estudos recentes demonstraram que o AG apresenta várias propriedades terapêuticas, como antidiarreicas (Namkung et al., 2010), antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e antineoplásica (Fiuza et al., 2004; Sameermahmood et al., 2010).

Os resultados desse estudo demonstraram atividade antimicrobiana de extratos aquoso de *Phoenix roebelenii* O'Brien sobre *Streptococcus mutans*, *Bacillus* sp. e *Enterococcus faecalis*, provavelmente atribuída à presença na constituição química de taninos e fenóis. Esses resultados divergem de dados citados por Al-Daihan & Bhat (2012), extratos mostraram atividade antibacteriana. Al-Daihan & Bhat (2012) citam que os extratos metanólico e de acetona de frutas, folha, sementes e cascas de tamareira (*Phoenix dactylifera*), são mais eficazes que os extratos aquosos. Na literatura não foi encontrado trabalhos relacionado ao efeito antimicrobiano de extrato aquoso oriundo da *Phoenix roebelenii* O'Brien o que amplia as informações científicas para esta espécie e instiga novas pesquisas.

2.5 Conclusão

O extrato aquoso de palmeira *Phoenix* mostrou-se eficaz frente aos micro-organismos orais *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* e as concentrações dos extratos aquosos (folíolo e caule) inibiram as células hepatoma murino Hepa-1c1c7, odontoblástóides MDPC- 23 e carcinoma de mama MCF-7 de forma concentração-dependente, apresentando ambos $IC_{50} = 278,5 \pm 16,71 \mu\text{g/mL}$.

Esses resultados indicam a possibilidade do extrato da *Phoenix* serem aplicados como agente antibacteriano e quimiopreventivo, demonstrando a necessidade de estudos adicionais.

2.6 Agradecimentos

Ao Laboratório Tommasi Analítica pela realização das análises cromatográficas, a colega de mestrado Suellen Geronimo Cordeiro pela colaboração no laboratório de Ciências Farmacêuticas e a UVV pela oportunidade da pesquisa.

2.7 Referências

Al-Daihan S, Bhat RS 2012. Antibacterial activities of extracts of leaf, fruit, seed and bark of *Phoenix dactylifera*. *African Journal of Biotechnology* 11: (10021-10025).

Ali H, Qaiser M 2009. The ethnobotany of Chitral valley, Pakistan with particular reference to medicinal plants. *Pak J Bot* 41: (2009-2041).

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 46: (446-475).

Biglari F, Alkarkhi AFM, Easa AM 2008. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry* 107: (1638-1641).

Buttler MS 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 22: (162-195).

Chuang CY, Liu HC, Wu LC, Chen CY, Chang JT 2010. Gallic acid induces apoptosis of lung fibroblasts via a reactive oxygen species-dependent ataxia telangiectasia mutated-p53 activation pathway. *J Agric Food Chem* 58: (2943-2951).

Cragg GM, Simon JE, Jato JG, Sander KM 1996. Drug discovery and development at the National Cancer Institute: Potential for new pharmaceutical crops. Progress in new crops. *ASHS Press* (554-560).

Cutter CV 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J Food Prot* 63: (601-607).

del Rayo-Camacho M, Phillipson JD, Croft SL, Marley D, Kirby GC, Warhurst DC 2002. Assessment of the antiprotozoal activity of *Galphimia glauca* and the isolation of new norsecofriedelanes and norfriedalanes. *Journal of Natural Products* 65: (1457-1461).

Dowson VHM 1982. Date production and protection. FAO plant production and production and protection. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 35: (1468-1475).

Ella KM, Vellimedu SK, Sunkara SSR, Gopinath K 2007. A stable formulation for treatment of respiratory disorder. Century Biologicals May, 18 2007: WO 2007/054958.

Eong YJ, Hong FA, Tomas-Barberan AA, Kader S, Alyson E 2006. The flavonoid glycosides and procyanidin composition of Deglet Noor dates (*Phoenix dactylifera*). *J Agric Food Chem* 54: (2405-2511).

Fabricant DS, Farnsworth NR 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 109: (69-75).

Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girão da Cruz MT, Cordeiro, MN, Milhazes N, Borges F, Marques MP 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties – a structural – activity relationship study. Part1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acid. *Bioorg. Med. Chem* 13: (3581-3589).

Gilani AH, Rahman AU 2005. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100: (43-49).

Hemingway RW, Gross GG, Yoshida, T 1999. Plant polyphenols: Chemistry and Biology. *Plenum Press*.

Hsu CL, Yen GC 2007. Effect of gallicacido on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosi and oxidative stress in rats. *Brazil J Nut* 98: (727-735).

Iossi E, Sader R, Pivetta LKF Barbosa CJ 2003. Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de tamareira-an (Phoenix roebelenii O'Brien). *Revista Brasileira de Sementes* 25: (63-69).

Iossi E, Sader R, Pivetta LKF, Barbosa CJ 2007. Maturação fisiológica de sementes de Phoenix roebelenii O'Brien. *Revista Brasileira de Sementes* 29: (147-154).

Ishurd O, Sun C, Xiao P, Ashour A, Pan Y 2002. A neutral B-D-glucan from dates of the date palm, Phoenix dactulifera L. *Carbohydrate Research* 337: (1325-1328).

Ishurd O, Ali Y, Wei W, Bashir F, Ali A, Ashour A, Pan Y 2003. Analkali-solubleheteroxylanfromseedsof Phoenix dactylifera L. *Carbohydrate Research* 338: (1609-1612).

Khan MA, Inayat H, Khan H, Saeed M, Khan I, Rahman I 2011. Antimicrobial activities of the whole plant of Cestrum nocturnum against pathogenic microorganisms. *Afr J Microbiol Res* 5: (612-616).

MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen L, Snead M 1995. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res* 33: (97-103).

Morón EB, Calderón-Montão JM, Orta L, Pastor N, Pérez-Guerrero C, Austin C, Mateos S, López-Lázaro M 2012. The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in Cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60: (7384-7391).

Mosa JS, Hifnawy MS, Mekkawi AG 1986. Phytochemical and biological investigations on date palm seeds (*Phoenix dactylifera* L.) produced in Saudi Arabia Arab. *Gulf. J Sci Res* 4: (495-507).

Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods* 65: (55-63).

Nagamine MK 2005. *Efeitos dos extratos etanólico, butanólico ou aquoso de Pfaffia paniculata sobre a proliferação de linhagens tumorais de células mamárias humanas*. São Paulo, 75p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Namkung W, Thiagarajah JR, Phuan PW, Verkman AS 2010. Inhibition of Ca²⁺ - activated Cl⁻ channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea. *Faseb Journal* 24: (4178-4186).

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas P, Silva GL 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: (247-256).

Newman DJ, Cragg GM Snader KM 2003. Natural products as Sources of New Drugs over the Period. *J Nat Prod* 66: (1022-1037).

Newman DJ, Cragg GM 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: (461-477).

Nisar M, Kaleem WA, Qayum M, Hussain A, Zia-Ul-Haq M, Ali I, Chodhary MI 2010. Biological screening of *Zupiphus Oxiyphylla* edgew leaves. *Pak J Bot* 42: (4063-4069).

Novais TS, Costa JFO, David JPL, David JM, Queiroz LP, França F, Giuliatti AM, Soares MBP, Santos RR 2003. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Rev Bras Farmacogn* 13: (05-08).

Ow YY, Stupans I 2003. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 4: (241- 248).

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC 2007. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. *Rev Odontol (Unesp)* 36: (163-168).

Patwardhan B 2005. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journalof Ethnopharmacology* 100: (50–52).

Phan TT, Sun L, Bay BH, Chan SLY, Lee ST 2003. Dietary compounds inhibit proliferation and contraction of keloid and hypertrophic scar-derived fibroblasts in vitro: therapeutic implication of excessive scarring. *Journal Trauma* 54: (1212-1224).

Pereira AA, Cardoso MG, Abreu LR 2008. Caracterização química e efeitos inibitórios de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia* 32: (887-893).

Perveen K 2012. *Antibacterial activity of Phoenix dactylifera L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram positive pathogenic bacteria*. <http://www.academicjournals.org/JMPR>, acesso em novembro de 2012.

Puupponem PR, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hoppa A 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: (494-507).

Qadrie ZL, Jacob B, Anandan R, Raj Kapoor B, Ulla MR 2009. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Indoneesiella Echioides* (I) Nees. Evaluated by the filter paper disc method. *Park J Pharm Sci* 22: (123-125).

Sameermahmood ZS, Raji L, Saravanan T, Vaidya A, Mohan V, Muthuswamy B 2010. Gallic acid protects RINm5F β -cells from glucolipotoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions. *Phytother Rev Suppl* 24: (83-94).

Samiullah BA, Bano A, Naz R, Yasmin H 2011. In vitro inhibition potential of lespedeza bicolor Turcz against selected bacterial and fungal strains. *J Med Plant Res* 05: (3708-3714).

Seelig RA 1974. Fruits and vegetables facts and pointers. *United Fresh Fruit and Vegetable Association*, Washington, DC, USA.

Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelarr R, Alakomi HL, Wright A 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Rev Food and Chemical Toxicology* 37: (813-823).

Suffness M, Pezzuto JM 1991. Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity. London: *Academic Press*.

Zhu Z, Xiu-meiGao JL, Amponsem E, Kang L, Hu L, Zhang B, Chang Y 2012. Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygonimultiflori* by LC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 62: (162-166).

Ziouti AC, Modafar EL, Fleuriet AS, Boustani EL, Macheix JJ 1996. Phenolic compounds in date palm cultivars sensitive and resistant to *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum*. 38: (451-457).

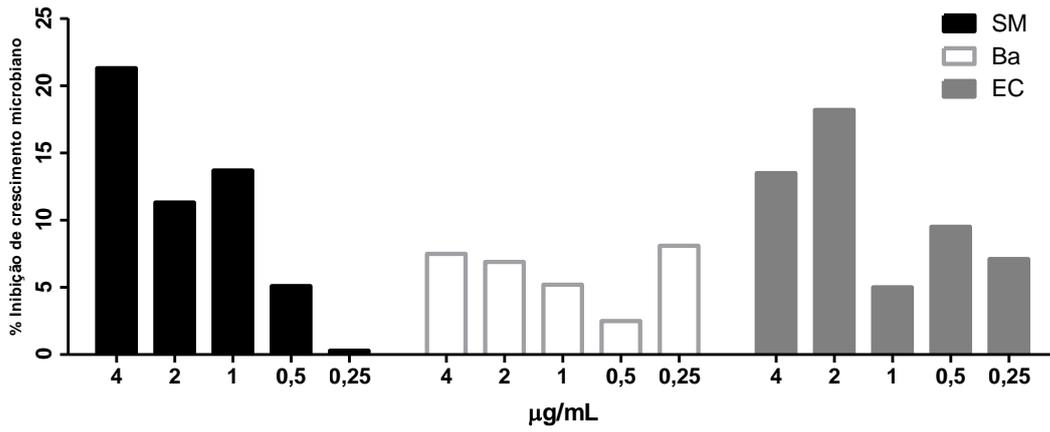


Figura 01: Efeito antimicrobiano após tratamento com extratos de palmeira *Phoenix*.

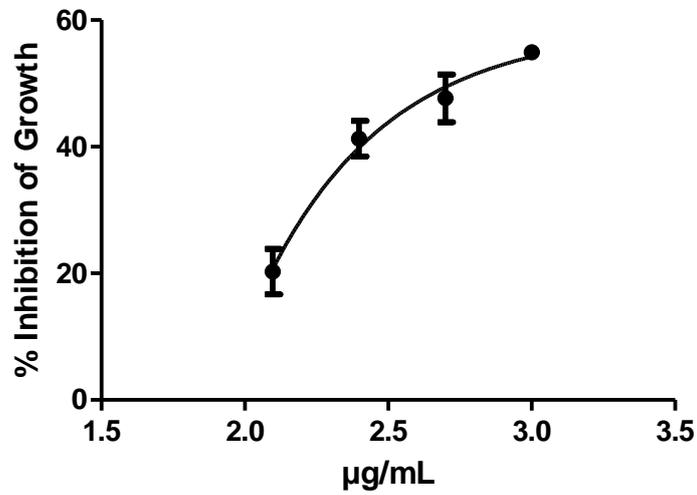


Figura 02: Curva de IC₅₀ MCF-7 para PF folíolos.

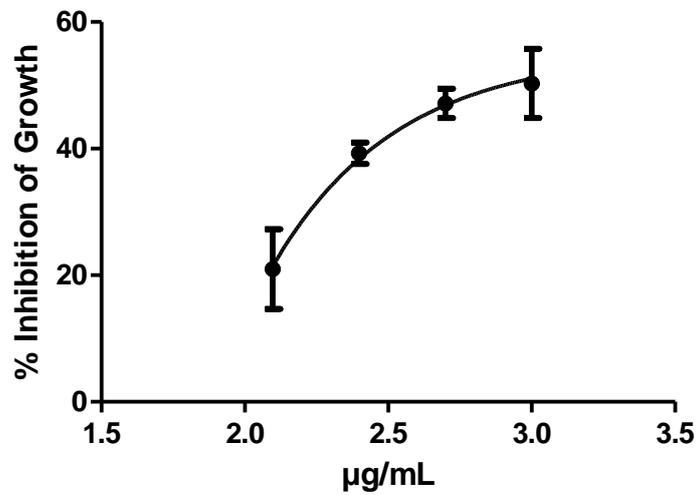


Figura 03: Curva de IC₅₀ MCF-7 para PF caule.

St	Linear range (µg/ml)	LD (µg/ml)	LQP (µg/ml)
Fer	1,1-0,0172	0.00216	0.0172
Caf	0,5-0.00781	0.0026	0.0078
Ros	2.6-0.04063	0.0382	0.0406
Gal	9.2-0.14375	0.0030	0.1438
Api	0.2875-0.00449	0.0025	0.0045
Que	0.03125-2	0.0117	0.0313

Tabela 01: Substâncias identificadas por comparação do tempo de retenção e o espectro com as soluções padrões.

Substância	PF Folha	PF caule	PF aquoso
Ac gálico	143,65±0,85	143,28±1,59	144,32±1,93
Ac cafeico	-	-	-
Ac clorogênico	-	-	29,77±0,02
Ac Rosmarinico	-	-	-
Apigenina	-	-	-
Quercetina	5,05±?	4,09±?	-

Tabela 02: Composição Química por (LC/MS/MS) dos extratos de *Phoenix roebelenii* O'Brien.

3 REFERÊNCIAS

Abdul A, Allaith A 2008. Antioxidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera* L) fruit of various cultivars. *International Journal of Food Science and Technology* 43: (1033-1040).

Al-Daihan S, Bhat RS 2012. Antibacterial activities of extracts of leaf, fruit, seed and bark of *Phoenix dactylifera*. *African Journal of Biotechnology* 11: (10021-10025).

Al-Farsi M, Alasalvar C, Morris A, Baron M, Shahidi F 2005. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: (7592-7599).

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de Fitoterápicos. Diário oficial da União.

Feitosa EM, Lima DKS, Santos EFP, Lima CB, Souza MA 2004. Fitoterapia como uma alternativa na prevenção e Tratamento de vulvovaginites. 7^o Congresso Brasileiro dos Conselhos de Enfermagem. Fortaleza, Brasil.

Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellstrom JH 2006. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42: (320-323).

Iossi E, Sader R, Pivetta LKF, Barbosa CJ 2003. Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de tamareira-anã (*Phoenix roebelenii* O'Brien). *Revista Brasileira de Sementes* 25: (63-69).

Iossi E, Sader R, Pivetta LKF, Barbosa CJ 2007. Maturação fisiológica de sementes de *Phoenix roebelenii* O'Brien. *Revista Brasileira de Sementes* 29: (147-154).

Ishurd O, Sun C, Xiao P, Ashour A, Pan Y 2002. A neutral B-D-glucan from dates of the date palm, *Phoenix dactulifera* L. *Carbohydrate Research* 337: (1325-1328).

Ishurd O, Ali Y, Wei W, Bashir F, Ali A, Ashour A, Pana Y 2003. An alkali-soluble heteroxylan from seeds of *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Research* 338: (1609-1612).

Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzzel A, Witt NM 2005. Atividade Antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jabolão [*Syzygium cumini* (L.) Skells]. *Revista Ciência Rural* 35: (316-320).

Marcus DM, Snodgrass WR 2005. Do no Harm: Avoidance of herbal medicine during pregnancy. *Obstet & Gynecol* 105: (1119-1122).

Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods* 65: (55-63).

Nadkarni KM 1976. Indian Materia Medica Vol 1. Mumbai: Bombay popular prakashan Pvt. Ltd.

Nardone RM 1977. Toxicity testing *in vitro*. In: Rottblat GH, Cristofalo VJ (Ed.). Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. *Academic Press* 3: (471-495).

Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KR, Trajano VN, Silva-filho RN 2006. Estudo da interferencia de oleos essenciais sobre a atividade de alguns antibioticos usado na clínica. *Revista Brasileira de Farmacologia* 16: (77-82).

Oliveira CJ, Araujo TL 2007. Plantas Mediciniais: Usos e crenças de idosos portadores de hipentensão arterial. *Revista Eletrônica de Enfermagem* 09: (93-105).

Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL 2004. Chemical constituents *in Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origino f southeastern Brazilian Propolis. *J. Agric. And Food Chem* 52: (1100-1103).

Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ 2002. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro* 16: (599-607).

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR 2004. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora UFRGS.

Van Vuuren SF, Suliman S, Vijoer AM 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol* 48: (440-446).

Vayalil PK 2002. Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. *Arecaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: (610-617).

Whitman TJ 2008. Community-associated methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Disease-a-Month* 54: (780-786).

ANEXO – Normas para publicação



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Aim and editorial policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Submission of manuscripts](#)

ISSN 0102-695X *printed version*

ISSN 1981-528X *online version*

Aim and editorial policy

The **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Brazilian Journal of Pharmacognosy) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and divulgation in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

Original Articles (in Portuguese, English or Spanish): it refers to unpublished research works. They must follow the usual presentation form, containing Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, etc, according to the peculiarities of each work.

Review Articles (in Portuguese, English or Spanish): they are directed to the presentation of the progress in a specific area of Pharmacognosy, containing a critical view, with the main objective of benefiting the group formed by post graduating students and non-specialists in the area. The RBFAR [Editors](#) can, fortuitously, invite qualified researchers to submit review article. It is desirable that the author has publications in the refereed area.

Divulgation Articles (in Portuguese, English or Spanish): presentation of some aspect or area of Pharmacognosy, written down in a didactic way, with the objective of benefiting the group formed by graduating and post graduating students, non-specialists in the area, pharmacists and professors of alike areas.

Form and preparation of manuscripts

GENERAL RULES

1.1 All submitted manuscripts should be unpublished. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not acceptable. The rights of publication are reserved, including translations; subsequent publication is allowed with the citation of the source.

1.2 The **Revista Brasileira de Farmacognosia** receives for publication original scientific work, reviews and divulgation articles written only in English. The content of

the text is the entire responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the [Editor, Section Editors or the members of the Editorial Board](#).

1.3 Language of publication is English. Manuscripts written by authors whose mother language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission to improve the English. Assistance of independent editing services can be found at <http://journalexperts.com?rcode=BJP>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

1.4 The **Revista Brasileira de Farmacognosia** reserves the right to submit all received manuscripts to ad hoc referees, whose names will be kept confidential and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may send back manuscripts to [Editor-in-Chief](#) for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations to the manuscripts which are to be made in order to conform to the standards and editorial rules of the Journal.

1.5 Every idea and conclusion presented in a published paper are the exclusive responsibility of the author(s), and do not necessarily reflect the opinion of the Editor, Section Editors or the members of the Editorial Board.

1.6 Every article involving studies with humans or animals should have the approval of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong, authorizing such studies.

1.7 All plant materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the plant material and the location of the voucher specimen. Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection.

1.8 The following immediate rejection criteria apply: i) the manuscript does not fall into of the areas of interest of the Journal; ii) the manuscript is too preliminary, reporting activity data without comparison to a reference, or without a positive control; iii) the botanical source is not clearly identified, authenticated, and documented; iv) experimental studies of antimicrobial and antioxidant activity with crude extract, without isolation and identification of active compounds.

2. RULES FOR THE ELABORATION OF THE CONTRIBUTIONS

2.1 The **author(s)** should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript, in the event the loss or damage to the original sent to the journal.

2.2 The **figures** (photographs, charts, drawings etc.) should be presented after the References and numbered consecutively in Arabic numbers. The respective captions should be clear, concise, without abbreviations, and be located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript.

2.3 **Tables and charts** should be presented after the References and numbered consecutively using Arabic numbers. The tables (numeric data) should not be closed

by side lines. The respective captions should be clear, concise, without abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables or charts should be placed, preferentially, just after their citation in the body of the manuscript.

2.4 The **captions of botanical illustrations** should be in accordance with the rules adopted by the Journal. Request the standards to revista@sbfgnosia.org.br.

3. TEXT FORMATTING AND CONTENTS OF THE WORK

3.1 Original Papers. Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figure with Legends, Tables, Structural Formulas. Results and Discussion sections may appear as two separate parts or as a combined "Results and Discussion" section. The normal length of the main text of an Original Paper, excluding references, tables, figures and figure legends, is about 3,000 words. In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement, giving compelling reasons for the length of the paper.

3.2 Short communication: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical fonts, or complementary results of an ongoing work. The communication should be arranged in the order: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Materials and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References up to 20 citations, Figure and/or Tables up to 3. Authors should limit the text, which should not exceed 2,000 words.

3.3 Reviews will generally be invited by the Editor-in-Chief. They should be as concise as possible and do not need to include experimental details. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in this area.

3.4. In addition to the Guidelines, a template (for original papers) and a sample letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are urged to follow these formats when preparing a manuscript.

3.5 The originals should be printed on A4 size paper, double spaced using Times New Roman font, font size 12, fully justified, and with margins of 2 cm. They should have a maximum of fifteen and a minimum of five pages including figures, tables and charts.

3.6 Title and subtitle: They should be in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the Journal. They should be in lower case, using Times New Roman size 14 font. Plant name should be complete including author name and Family according to <http://www.tropicos.org>.

3.7 Authors: The authors' names should appear underneath the title, centered. The first and last name should appear complete, followed by the initials of all other names

(e.g. Carlos N. U. Silva or Carlos N. Ubiratan Silva). In the case of several authors, their names should be separated by commas.

3.8 Authors' affiliation: After each author name there should be superscript Arabic numbers indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the main author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address and telephone of the main author should appear as a footnote at the first page. The Journal will not publish commercial e-mail address.

3.9 Abstract: A brief and concise abstract (maximum 200 words) of the article, in either the Portuguese and English language, highlighting the more important information, the methodology, the results, and the conclusions. This will allow the reader to evaluate their interest in the article and thus avoid having to read the full work. For authors outside Brazil, the abstract in Portuguese will be done by the journal.

3.10 Keywords: The authors should identify a maximum of six Keywords to represent the content of the article. Keywords are very important for data base searches, thus validating the article. The keywords should be separated by commas.

3.11 Introduction: The Introduction should clearly establish the objective of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references to more recent publications, where these reviews have been published and are available.

3.12 Material and methods: The description of the material and the methods used should be brief, but sufficiently clear to make possible the comprehension and the reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced.

3.13 Results: The Results should be presented with a minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by adequate tables and figures. The data, when pertinent, should be submitted to statistical analysis.

3.14 Discussion: The Discussion must be restricted to the significance of the obtained data and the achieved results, avoiding conclusions not based on them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion could be presented in one section.

3.15 Acknowledgements: This is an optional item and should appear before the references.

4. REFERENCES

The formatting of references should be standardized to conform to the requirements of the journal as outlined:

4.1 References inside the text: in the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); in the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. e.g. (Silva, 1999)

or (Silva & Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: provide also the page, e.g. (Silva, 1999, p. 24).

4.2 The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

4.2.1 Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>). In the case of the authorized abbreviation of a certain periodical can not be located and it is not obvious, the title should be cited complete (e.g.): Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: (100-105).

In case the cited journal can not be easily accessible, it is recommended to present its Chemical Abstract Number, as follows: Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

In a citation in a citation the sources should be shown in italics: Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.).

4.2.2 Book: Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Book chapter: Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman GT (org.). *A nova odontologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Thesis or dissertation materials: Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congress: Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófi los humanos. *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patents: Should be identified as indicated below, whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be informed. Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 61,118,396, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Internet pages: Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>, acesso em outubro 2009.

5. ABBREVIATIONS

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are: m meter; ppm parts per million; cm centimeter; cpm counts per minute; mm millimeter; dpm disintegrations per minute; μm micrometer; nm nanometer; kg kilogram; g gram; mg milligram; μg microgram; ng nanogram; LD50 medial lethal dose; mL milliliter; LC50 medial lethal concentration; μL micro liter; Hz hertz; s seconds; M molar; min minutes; mM millimolar; h hours; M molar; μM micro molar; SD standard deviation; N normal; SE standard error; Ci Curie; TLV threshold limit value; X mean When using a word that is or is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ®.

6. ILLUSTRATION

6.1 The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

6.2 Remove all color from graphics, except for those graphics that you would like to have considered for publication in color (see Costs section below for details).

6.3 Upload each figure in either .tiff, .jpg or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the figure legend.

7. COSTS

The journal will cover totally the costs of publication of papers of up to fifteen pages, including tables and figures. Above this number of pages, the expenses will be charged to the author(s). Color pictures will not be accepted, unless the author(s) covers the extra expenses for their publication, independent of the number of pages of the article.

8. PROOFS AND REPRINTS

Galley proofs will be sent to the corresponding author as a PDF file. Rephrasing of sentences or additions are not permitted at the page proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within five days of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

For further information, please contact:

Revista Brasileira de Farmacognosia
Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor
Laboratório de Farmacognosia
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br

Submission of manuscripts

Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://submission.scielo.br/index.php/rbfar/login>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by email will not be accepted.

IMPORTANT: All authors, with their respective email addresses, should be entered into the system.

The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees' indicated by the Editorial Board.