

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

***Atividade anti-inflamatória in vitro de *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc.
(Lycopodiaceae) em linhagem celular J774A1***

Rafael Labandeira da Silva

Porto Alegre, junho de 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**Atividade anti-inflamatória *in vitro* de *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc.
(Lycopodiaceae) em linhagem celular J774A1**

Rafael Labandeira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath

Porto Alegre, junho de 2019

Esse Trabalho de Conclusão de Curso foi redigido sob a forma de artigo ao qual foi elaborado segundo as normas da revista "Journal of Ethnopharmacology", apresentadas em anexo.

AGRADECIMENTOS:

A minha família pelo amor, apoio e carinho durante toda a faculdade, mas acima de tudo a minha mãe, que é meu maior exemplo de superação;

A todos os amigos de longa data que já são praticamente parte da família e aos amigos que a faculdade me proporcionou, sendo responsáveis pela minha chegada até aqui;

A minha namorada Eliane, que apareceu ao decorrer da trajetória e fez muita diferença, sempre me apoiando e fazendo eu me tornar uma pessoa melhor;

A todos os colegas de trabalho, mas principalmente ao Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath, por todos os ensinamentos, auxílio e amizade ao longo desse projeto e dos últimos anos;

Ao LATOX, pela possibilidade de realizar parte do trabalho, mas em especial ao Prof. Dr. Marcelo Arbo, Larissa Vivan e Yasmin Pitton, que sempre me ajudaram quando foi preciso;

A todos os professores do curso de Farmácia que me passaram conhecimento e contribuíram para o meu crescimento profissional;

À UFRGS, que me acolheu em 2014 e foi minha segunda casa até então, e hoje me despeço momentaneamente.

**Atividade anti-inflamatória *in vitro* de *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc.
(Lycopodiaceae) em linhagem celular J774A1**

Rafael Labandeira da Silva^a, Larissa Vivan Cestonaro^{b,c}, Viviane Sebben^d, Solange Cristina Garcia^{b,c}, Marcelo Dutra Arbo^{b,c}, Eduardo Luis Konrath^{a,c,*}

^aLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bLaboratório de Toxicologia, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^dCentro de Informação Toxicológica, Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul – CIT-RS, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor Correspondente

E-mail:eduardo.konrath@ufrgs.br (E. L. Konrath)

Resumo:

Introdução: *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc. (Lycopodiaceae) é uma espécie rica em produtos químicos, como triterpenos e alcaloides, amplamente distribuída e reconhecida por vários usos na medicina tradicional, mas principalmente na forma de decocção no tratamento de doenças reumáticas. Embora relativamente comum na natureza, a ausência de informações relevantes e a busca constante por novos compostos que possuam potencial anti-inflamatório fez com que o objetivo do presente estudo fosse validar o uso etnofarmacológico de *P. cernua* e avaliar o potencial anti-inflamatório a partir de uma decocção (DEC) da planta, assim como avaliar o potencial de um extrato de dois alcaloides (EAT) já relatados em sua composição: cernuína e licocernuína.

Materiais e Métodos: Foi realizada maceração de partes aéreas de *P. cernua* em etanol, o extrato etanólico acidificado foi purificado e ficado com HCl 5%, a fração ácida alcalinizada foi particionada com CH₂Cl₂, para obtenção do EAT. Para a decocção, a planta foi fervida com água por 20 minutos, posteriormente filtrada e liofilizada. Os extratos foram analisados por cromatografia a gás equipada com espectrômetro de massas (CG-EM) quanto a presença dos alcaloides cernuína e licocernuína, para posterior avaliação *in vitro* utilizando macrófagos de murino J774A1. A citotoxicidade foi medida pelos ensaios de citotoxicidade (MTT e vermelho neutro), o potencial de membrana mitocondrial foi medido através da captação de TMRE, a produção de radicais livres foi determinada através da oxidação do DCFH-DA e o potencial anti-inflamatório foi medido através da quantificação do óxido nítrico pela reação de Griess na presença de lipopolissacarídeos (LPS).

Resultados e Discussão: Cernuína (DEC: 46,89%; EAT: 44,05%) e licocernuína (DEC: 32,89%; EAT: 42,93%) foram detectadas em ambos os extratos. DEC não demonstrou citotoxicidade em células J774A1, entretanto o EAT demonstrou-se tóxico a partir de 250 µg/mL. Nenhum dos extratos apresentaram dano mitocondrial, nem alteração na produção de radicais livres. DEC não demonstrou potencial anti-inflamatório, no entanto, o EAT diminuiu a produção de óxido nítrico na presença do LPS em todas as concentrações usadas. **Conclusão:** *P. cernua* usada popularmente não é tóxica, mas aparentemente não possui atividade anti-inflamatória, ao contrário do EAT, que demonstrou resultados representativos na inibição da inflamação, o que pode estar relacionado com a diferença na concentração de alcaloides em ambos extratos.

Palavras chave: alcaloides; cernuína; licocernuína; *Palhinhaea cernua*; atividade anti-inflamatória

*E-mail do autor correspondente:

eduardo.konrath@ufrgs.br

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Materiais e métodos.....	11
2.1 Material vegetal.....	11
2.2 Preparação da fração enriquecida em alcaloides.....	11
2.3 Preparação da decocção.....	12
2.4. Isolamento dos alcaloides.....	12
2.5. Identificação dos alcaloides.....	13
2.6. Cultivo celular.....	13
2.7. Ensaio de citotoxicidade.....	14
2.7.1. Ensaio de redução do MTT.....	14
2.7.2. Ensaio de captação do vermelho neutro (VN).....	15
2.8. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs).....	15
2.9. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	16
2.10 Produção de óxido nítrico (NO).....	16
2.11 Análise estatística.....	17
3. Resultados.....	17
3.1 Extratos de <i>P. cernua</i>	17
3.1.1 - Análise química.....	17
3.2 Ensaio <i>in vitro</i>	19
3.2.1 Atividade citotóxica.....	19
3.2.2 Atividade sobre a produção intracelular de EROs e ERNs.....	20
3.2.3 Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	21
3.2.4 Efeitos sobre a produção de óxido nítrico (NO).....	22
4. Discussão.....	23
5. Conclusão.....	26
6. Referências Bibliográficas.....	26
ANEXO 1.....	31

1. Introdução

O processo inflamatório fundamentalmente consiste em uma resposta inespecífica de autodefesa do organismo, visando a proteção em decorrência de qualquer episódio que afete o equilíbrio do mesmo (Sobota *et al.*, 2000), seja ele decorrente de alguma lesão, infecção ou pela presença de qualquer micro-organismo invasor (Gil, 2002). A inflamação pode ser um processo agudo, apresentando curta duração e caracterizada por alterações vasculares e migração leucocitária, principalmente neutrófilos, e depois monócitos (Serhan e Savill, 2005). É a partir da migração desses componentes que se inicia a resposta inflamatória, com o auxílio de diversos mediadores químicos, como histamina, citocinas, prostaglandinas, responsáveis diretos pelos principais sinais: calor, rubor, edema e dor (Robbins, 1996).

Independente da causa, gravidade ou local, a lesão gerada no processo começa a ser reparada a partir das primeiras alterações celulares, sendo um processo finito e que, ao solucionado, retorna a normalidade no local afetado (Nathan e Ding, 2010). Porém, quando não solucionado completamente, algumas mudanças importantes passam a acontecer, como o prolongamento do tempo de duração e a presença predominante de macrófagos no local da lesão (Robbins, 1996), progredindo para um estágio crônico, sendo responsável muitas vezes pelo surgimento de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, aterosclerose, esclerose múltipla entre outras (Nathan e Ding, 2010).

Entre as principais alternativas farmacológicas, a utilização de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) é muitas vezes a primeira escolha, uma vez que os mesmos possuem atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória, apresentando um mecanismo de ação baseado na inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), diretamente ligada ao processo na inibição da produção dos mediadores da inflamação (Moncada *et al* 1973; Vane, 1976). Essa via é subdividida em COX-1 e 2, onde a primeira é chamada constitutiva, presente naturalmente no organismo, enquanto a segunda é chamada de indutiva, presente nas células principalmente em

quadros inflamatórios, mediante alguma situação que proporcione a inflamação (Chou et al., 2006). A inibição dessas vias contribui para a diminuição dos sintomas gerados pela inflamação; entretanto, essa classe de medicamentos também é caracterizada pela presença de muitos efeitos adversos, atingindo rins, fígado, coração, sistema nervoso central, mas principalmente relacionados ao trato gastrointestinal, como por exemplo, úlceras (Lichtenstein *et al.*, 1995; McKellar *et al.*, 2007).

A partir das restrições apresentadas, a busca por compostos que apresentem capacidade anti-inflamatória segue sendo alvo de diversos estudos, visando à potencialização dos efeitos e a minimização dos efeitos adversos, onde muitos estudos envolvendo plantas medicinais apresentam resultados promissores (Akkol, 2012; Russo *et al.* 2015).

A família *Lycopodiaceae* é alvo de diversos estudos, pois abriga muitas espécies que apresentam compostos químicos com atividades biológicas interessantes, como por exemplo, a *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, que apresenta em sua composição alcaloides quinolizidínicos, como a huperzina A, responsável pela atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Ma e Gang, 2008). Este alcaloide é até o momento o produto desta classe com maior potencial anticolinesterásico já descrito (Tang *et al.*, 1986), entretanto, diversas outras espécies possuem produtos já relatados e com boas perspectivas, como é o caso da *Palhinhaea cernua*.

Palhinhaea cernua (L.) Franco & Vasc. (Lycopodiaceae) [syn *Lycopodiella cernua* (L.) ou *Lycopodium cernuum* (L.)] é uma licófito amplamente distribuída nas regiões tropicais do mundo, incluindo a América Central, América do Sul, Ásia e África (Stehlé e Stehlé, 1962). Esta espécie é utilizada popularmente em diversas situações na forma de decocção para o tratamento de reumatismo, contusões e queimaduras (Zhang *et al.*, 1997). Em Madagascar, uma bebida feita com a planta inteira é empregada o tratamento de úlceras gástricas e neuralgia. Na América tropical, decocções de *P. cernua* são empregadas popularmente na forma de diurético, e para o tratamento da gota, disenteria, gonorreia e inchaços decorrentes da artrite. Na Ásia, é empregada como linimento para aplicação em abscesso e feridas, além de decocções para beri-beri, asma e tosse (Grubben e

Denton, 2004). *P. cernua* é amplamente empregada na China, estando presente na Farmacopeia deste país sob o nome de *Herba Lycopodii* ou *shenjincao* (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2010). Uma bebida feita com esta espécie e processada por ultracentrifugação é empregada na Medicina Tradicional Chinesa para o tratamento de reumatismo, disenteria e hepatite (He *et al.*, 1998). Investigações fitoquímicas conduzidas com a espécie *P. cernua* evidenciaram a presença de triterpenos e de alcaloides quinolizidínicos classificados como alcaloides de *Lycopodium*, uma vez que são comumente encontrados em espécies de Lycopodiaceae (Ma e Gang, 2004), servindo inclusive como marcadores quimiotaxonômicos (Pederson e Ollgaard, 1982). Estes produtos apresentam importantes atividades biológicas, comumente associadas a sua capacidade de inibição da enzima AChE, mecanismo de ação de medicamentos empregados para o tratamento da doença de Alzheimer. Já foram descritos para a espécie a presença dos alcaloides cernizinas A-D, cernuína, licocernuína, cernuína *N*-óxido e licocernuína *N*-óxido (Morita *et al.*, 2004). Além disso, licopodina, licodina, licodolina, licopladina B, huperzinas A, B e E e huperzinina também já foram previamente detectados nesta espécie através da técnica de UHPLC/ESI-TOF-MS (Ho *et al.*, 2009), bem como um novo alcaloide denominado 2-hidroxicornuína (Morel *et al.*, 2012). Dentre os triterpenos encontrados em *P. cernua*, todos são pertencentes à família dos serratenos, tais como os ácidos licocernuicos A-E e cetonas licocernuicas A-C (Zhang *et al.*, 2002). Alguns estudos também evidenciaram a presença de apigenina 4'-*O*-(2',6'-di-*O*-cumaroil)- β -*D*-glicopiranosídeo, ácidos clorogênico e cafeico, dentre outros (Pederson e Ollgaard, 1982; Zhang *et al.*, 2002).

Nesse sentido, estudos farmacológicos conduzidos com extratos da espécie evidenciaram seu potencial efeito para diversos modelos animais, como um inibidor da enzima xantina oxidase, responsável pela produção de ácido úrico (Jiao *et al.*, 2006) e responsável por doenças articulares e cardiovasculares quando produzido em excesso ou excretado insuficientemente (Alderman *et al.*, 1999); para o tratamento de úlceras (Cambie e Ash 1994); atividade antitumoral (Mandal *et al.*, 2010) e também como anti-amnésico, em um modelo de ratos com deficiência de memória induzida por escopolamina (Chuong *et al.*, 2014). Apesar dos relatos a respeito da atividade anti-inflamatória

para os alcaloides, poucos são aqueles efetivamente empregados na clínica, como a colchicina, usada especificamente para o tratamento da gota e com significativo grau de toxicidade (Malkinson, 1982)

Assim, o principal objetivo do estudo foi validar o uso etnofarmacológico de *P. cernua*, avaliando seu potencial anti-inflamatório e antioxidante através de um modelo *in vitro* com o uso de preparações da espécie, utilizando uma decocção (conforme o uso popular), e uma fração enriquecida em alcaloides.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

Partes aéreas de *Palinhea cernua* (L.) Franco & Vasc. foram coletadas no município de Jaraguá do Sul, SC, (coordenadas 26'33'4"S e 49'7'35"W) em março de 2017. A identificação da espécie foi realizada pelo Dr. André Luis de Gasper, da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Uma exsicata foi depositada sob o número FURB 53018 no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein, da Universidade Regional de Blumenau.

2.2 Preparação da fração enriquecida em alcaloides

O material vegetal (662,9 g) seco a temperatura ambiente foi triturado e submetido a um processo de maceração estática com etanol até seu esgotamento (3x 3 L). O extrato vegetal bruto assim obtido (7,52 g) foi concentrado e acidificado com solução de HCl 5%. Em seguida, este extrato foi particionado com CH₂Cl₂ e a fase orgânica desprezada. A fração ácida remanescente foi alcalinizada com NH₄OH até alcançar pH 12, havendo novo processo de partição com CH₂Cl₂. A

fase orgânica assim obtida foi recolhida, filtrada com o uso de sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório, obtendo assim o extrato de alcaloides totais, chamado EAT (0,48 g), mantido sob refrigeração (-30 °C) até o momento da realização dos experimentos. No momento da realização dos experimentos *in vitro*, o extrato foi solubilizado em DMSO e mantido novamente sob refrigeração.

2.3 Preparação da decocção

De acordo com a maneira em que a planta é consumida na medicina popular, novo extrato vegetal foi preparado empregando-se a decocção (DEC). Esta foi preparada de acordo com a literatura existente (Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2011; Birri *et al.*, 2017). Para a obtenção do decocto da espécie vegetal, a 35 g das partes aéreas secas e trituradas foram adicionados 700 mL de água destilada, sendo o sistema fervido durante 20 min. A decocção foi filtrada, resfriada e posteriormente liofilizada. A decocção liofilizada foi solubilizada em DMSO para a realização dos experimentos *in vitro*.

Com o propósito de se quantificar a presença de alcaloides na decocção, após a preparação, o decocto foi alcalinizado com NH₄OH até pH 12 e então particionado com CH₂Cl₂ (3 x 100 mL) em um funil de separação. As frações orgânicas assim obtidas foram reunidas, concentradas até a secura e analisadas quimicamente através de cromatografia a gás equipada com espectrômetro de massas (CG-EM).

2.4. Isolamento dos alcaloides

O EAT foi submetido a um processo cromatográfico para isolamento dos compostos presentes, através de processos sequenciais de cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em

camada delgada (CCD). Inicialmente, o EAT foi submetido a um processo de separação em coluna contendo sílica gel (20 g) como fase estacionária, sendo eluída com CH₂Cl₂ e metanol em ordem crescente de polaridade (100 % - 80:20), rendendo 4 frações principais reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico. Foi possível visualizar a presença de dois alcaloides distintos, que foram finalmente isolados a partir de CCD preparativa em sílica gel GF₂₅₄, utilizando-se como fase móvel CH₂Cl₂: MeOH:NH₄OH (90:10:1).

2.5. Identificação dos alcaloides

Para a identificação do perfil químico dos produtos presentes nos extratos (EAT e DEC), bem como dos alcaloides isolados foi empregada metodologia analítica com o uso de CG-EM Shimadzu QP5050A, com uma coluna capilar VF-5 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura de filme, e energia de ionização de 70 eV. Como gás de arraste, foi empregado hélio, com um fluxo de 1,2 mL/min. Foi empregado um programa de temperaturas com os seguintes parâmetros: temperatura do injetor: 280°C, temperatura do detector: 300°C. O programa de temperatura inicial da coluna foi iniciado a 230 °C e mantido durante 2 minutos. Em seguida, a temperatura alcançou 250°C com uma rampa de 10°C/min e assim se manteve por 4 minutos. Por fim, a coluna alcançou 280°C e assim se manteve durante o final da análise (Konrath *et al.*, 2013).

2.6. Cultivo celular

A linhagem de células utilizada foi a de macrófagos murino J774A1. O cultivo celular foi realizado em garrafas de cultura de 75 cm², na presença de meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de penicilina 0,5 U/mL e estreptomicina 0,5 mg/mL, incubados

a 37 °C em atmosfera de ar úmido contendo 5% de CO₂. Ao atingir cerca de 80% de confluência, as células foram descoladas do fundo da garrafa e plaqueadas a uma densidade de 1x10⁵ células por poço, em placa de 96 poços.

2.7. Ensaios de citotoxicidade

Para a realização dos ensaios, foram preparadas soluções-mãe na concentração de 125 mg/mL em DMSO e filtrada em condições estéreis. A partir dessa solução, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 250 µg/mL para DEC e EAT, diluídas em meio de cultura, sendo a concentração final no poço de DMSO de 0,1%.

2.7.1. Ensaio de redução do MTT

O ensaio de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), foi realizado conforme descrito anteriormente por Dias da Silva *et al.* (2013a). Após 24h do plaqueamento, o meio foi retirado e as células foram tratadas com as amostras (EAT ou DEC), sendo novamente incubadas por 24h. Em cada uma das placas foram incluídos controles negativos (apenas com meio de cultura e meio de cultura contendo 0,1% de DMSO) e controle positivo (Triton X-100 1%). Após 24h incubação, o meio de cultivo foi retirado e então adicionada a solução de MTT (0,5mg/mL). Os experimentos foram realizados sob proteção da luz, em decorrência do MTT ser fotossensível. Após 2 h de incubação, o meio de cultura celular foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. A absorbância foi medida a 590 nm em um leitor de placas. Os resultados foram expressos em % de controle.

2.7.2. Ensaio de captação do vermelho neutro (VN)

O corante vermelho neutro (VN) apresenta a capacidade de atravessar a membrana celular de células integras através do transporte passivo, mantendo-se dentro dos lisossomos (Nemes *et al.* 1979), entretanto, o mesmo não ocorre no caso de células lesadas. As células foram plaqueadas e, após 24 horas, incubadas com DEC ou EAT conforme descrito anteriormente e novamente incubadas por 24 horas. Após, o meio de cultura foi removido e foi adicionada a solução de vermelho neutro (50µg/mL). As células foram mantidas a 37°C, e o meio contendo o corante foi removido após 2 horas. Foi adicionado PBS para lavagem das células, e em seguida foi adicionada a solução de lise celular (50% etanol: 1% ácido acético glacial). A absorbância foi medida em 540 nm em um leitor de placas e a porcentagem de morte celular em relação ao controle foi utilizado como medida de citotoxicidade (Arbo *et al.*, 2014).

2.8. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs)

A produção intracelular de EROs e ERNs foi monitorada por incubação com diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), conforme descrito anteriormente por Dias da Silva *et al.* (2013b). Nesse sentido, este produto penetra nas células, sendo hidrolisado por esterases em DCFH, composto não fluorescente. Na presença de espécies reativas, ocorre a hidrólise do DCFH a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), composto de coloração fluorescente verde, com maior polaridade e retenção dentro das células (Rao *et al.*, 1992). Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi retirado e as células pré-incubadas com a solução de DCFH-DA 10 mM durante 30 min, a 37°C ao abrigo da luz. Após a pré-incubação, o conteúdo foi retirado e os poços lavados com PBS. Na sequência, EAT e DEC foram adicionados aos poços contendo as células. Como controles negativos, foram incluídos poços contendo apenas meio de cultura, e meio de cultura com 0,1% de DMSO. Como controle positivo foi utilizado LPS 1 µg/mL. Após um período de incubação de 24 h a 37°C, a

fluorescência foi registrada com auxílio de leitor de microplacas de fluorescência definido para 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Os resultados foram expressos em % de controle.

2.9. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

A avaliação da integridade mitocondrial foi realizada com o perclorato do éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE), conforme descrito anteriormente por Dias da Silva *et al.* (2013a). O TMRE é um corante fluorescente permeável às células e seletivo para mitocôndrias vivas, havendo acúmulo proporcional ao potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Scaduto e Grotyohann, 1999). Após 24 h do plaqueamento, as células foram lavadas e incubadas com as diferentes concentrações de EAT e DEC a 37°C. Ao final do período de incubação de 24 h, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas a 37°C com 200 μ l de solução de TMRE 2 mM durante 30 min. A fluorescência foi medida em um leitor microplacas de fluorescência definido para 544 nm de excitação e emissão de 590 nm. Os resultados foram expressos em % de controle

2.10 Produção de óxido nítrico (NO)

A avaliação da produção de óxido nítrico ocorre a partir de uma reação colorimétrica da diazotização dos nitritos com ácido sulfanílico e a reação com o cloridrato de alfa naftilamina em pH ácido, formando um ácido de coloração rosa. A reação foi realizada na presença de LPS, responsável por induzir a inflamação nas células, cabendo assim ao extrato, o papel de contornar o processo gerado. Após 24 h do plaqueamento, as células foram lavadas e incubadas com as diferentes concentrações de EAT e DEC, além de 1 μ g/mL de LPS a 37 °C. Ao final do período de incubação de 24 h, foram retirados 100 μ L do sobrenadante dos poços e transferidos para uma nova placa. Foi preparada uma curva padrão de nitrito de sódio em H₃PO₄ 5 %, de 0,2 a 200 μ M e adicionada a mesma placa. A partir de sulfanilamida 2% e de *N*-(1-naftil)etilenodiamina (NED)

0,2% em proporções iguais, foi preparado o reagente de Griess e adicionado em todos os poços. A placa foi incubada por 20 minutos a 37°C e a presença dos nitritos gerados foi lida a 540 nm. Em cada uma das placas foram incluídos controles negativos (meio de cultura, meio de cultura contendo 0,1% de DMSO, meio de cultura contendo LPS (1 µg/mL) e controles positivos (ácido acetilsalicílico 5 µg/mL)

2.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. A normalidade foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. O nível de significância foi de 5%. As comparações estatísticas entre os grupos foram avaliadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A análise foi realizada no programa GraphPad versão 5.0 para Windows.

3. Resultados

3.1 Extratos de *P. cernua*

3.1.1 - Análise química

O rendimento do extrato de alcaloides totais (EAT) a partir da droga seca foi de 0,07 %, e de 6,38 % a partir do extrato vegetal bruto, o rendimento da decocção foi de 8,29 %. Nesse estudo, as análises dos grupos DEC e EAT levaram ao isolamento e caracterização de dois alcaloides previamente descritos, cernuína e licocernuína (Fig. 1), em uma proporção de 44,05 e 42,93%, respectivamente. Após uma extração alcalina empregando-se CHCl₃, foram encontrados na decocção os mesmos alcaloides, porém na proporção de 46,89 e 32,89%, respectivamente. O perfil

cromatográfico dos alcaloides foi analisado através de cromatografia gasosa (Figura 2) e espectrometria de massas (Figura 3).

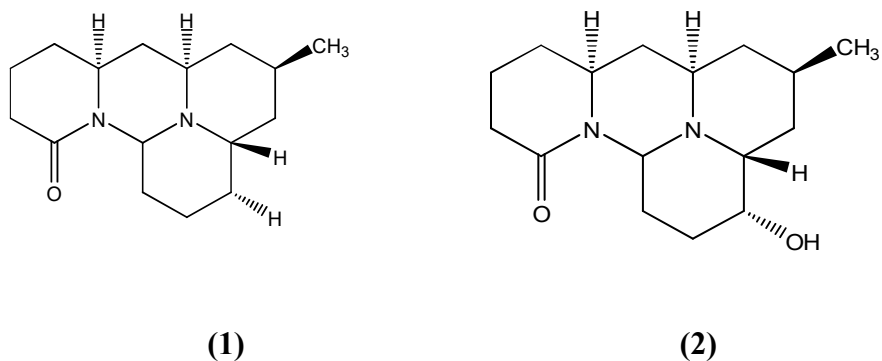


Figura 1: Estruturas dos alcaloides cernuína (1) e licocernuína (2), identificados em *P. cernua*.

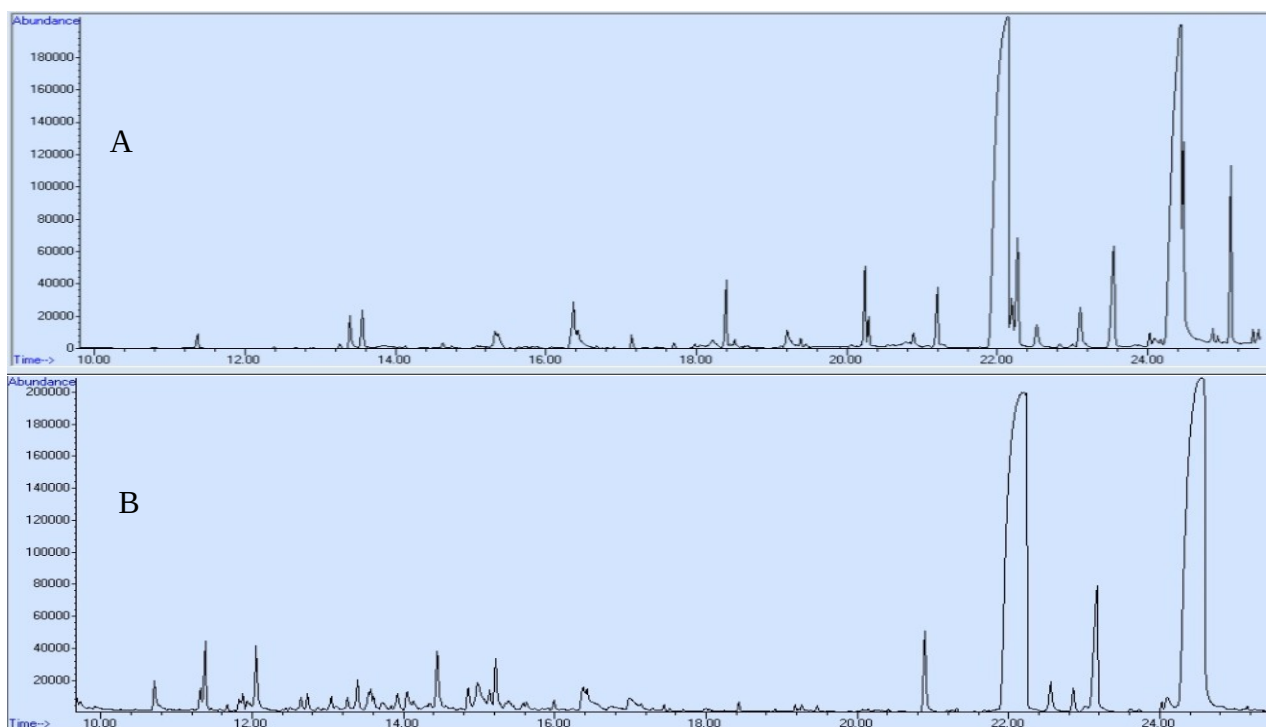


Figura 2: Perfil obtido através de análise por CG-EM e identificação dos compostos no decocto (DEC) (2A) e extrato de alcaloides totais (EAT) (2B): cernuína (tR = 22,00 min) e licocernuína (tR = 24,00 min).

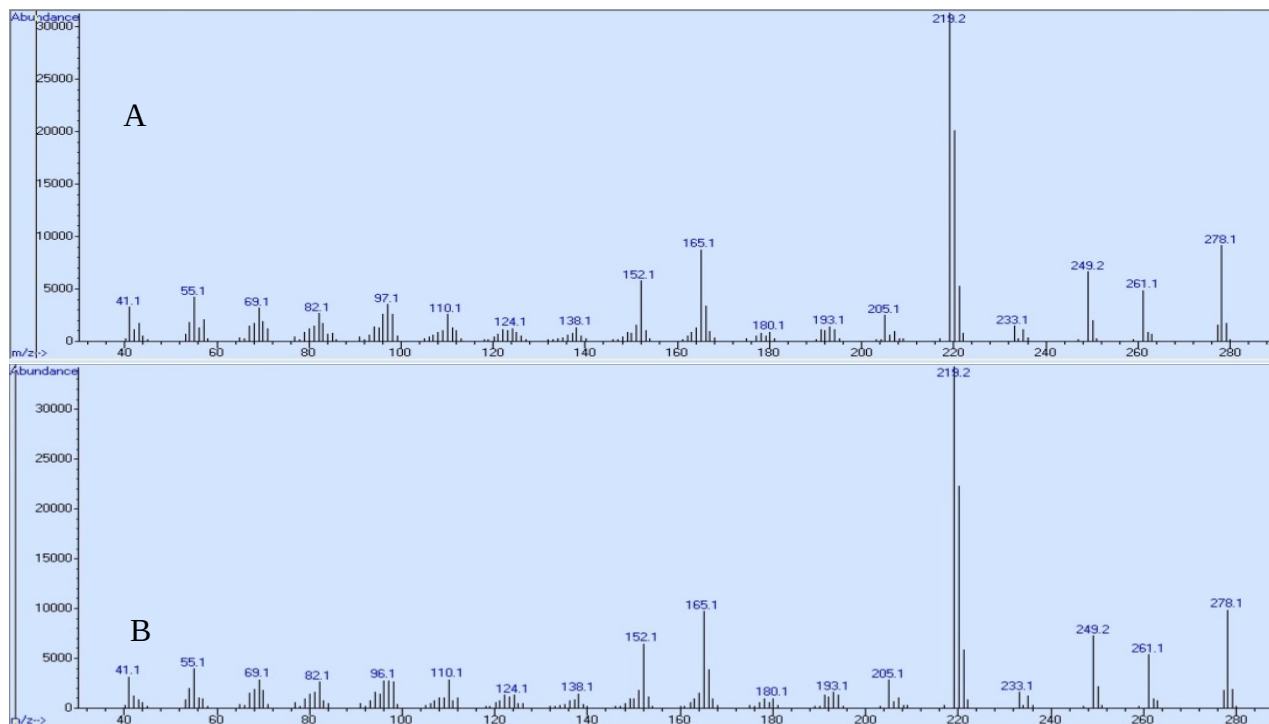


Figura 3: Perfil de fragmentação dos alcaloides encontrados: (3A) cernuína ($m/z = 262$) e (3B) licocernuína ($m/z = 278$).

3.2 Ensaio *in vitro*

3.2.1 Atividade citotóxica

Para avaliar o grau de citotoxicidade do DEC e EAT, foram realizados ensaios de citotoxicidade através dos métodos de MTT (Figura 4A) e VN (Figura 4B). Para o DEC, não foram observadas diferenças significativas com o aumento das concentrações; entretanto, a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$, o EAT demonstrou toxicidade às células tanto no ensaio de MTT como de VN.

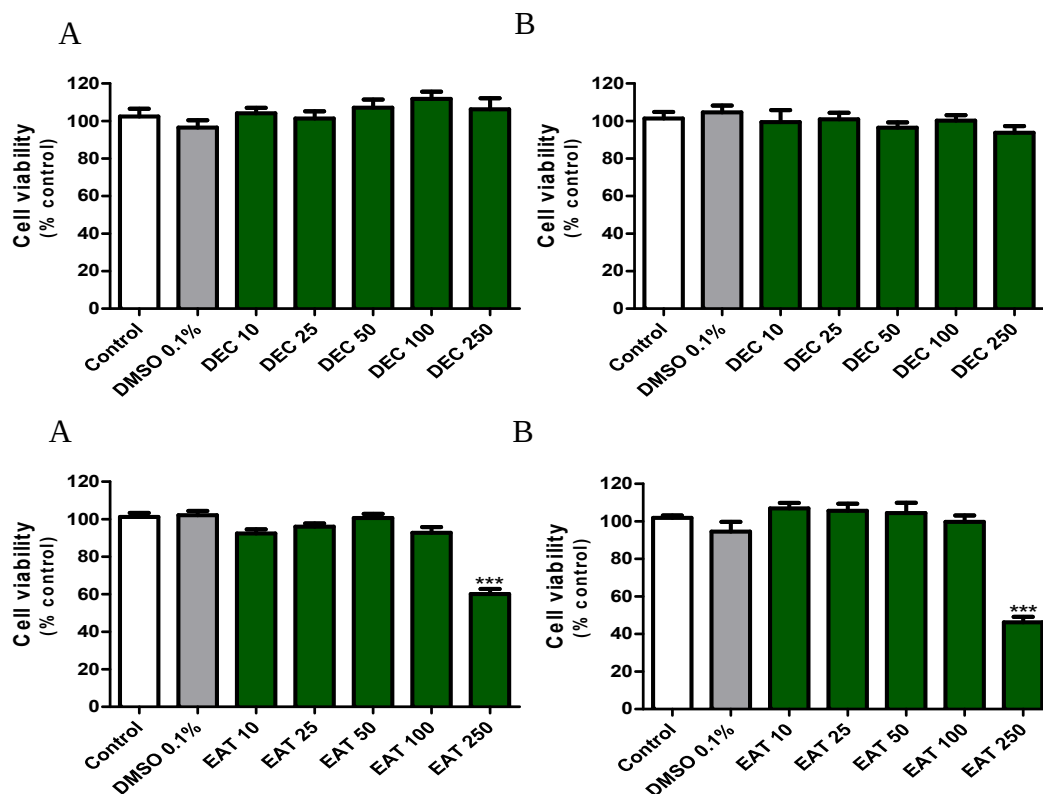


Figura. 4. Efeitos da DEC e do EAT sobre a viabilidade celular avaliada através da redução do MTT (A) e captação do VN (B), em células J774A1 após 24 h de incubação. Os valores são expressos como médias \pm EPM de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$ vs. controle.

3.2.2 Atividade sobre a produção intracelular de EROs e ERNs

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada pelo ensaio DCFH-DA (Figura 5). Foi possível notar uma elevada produção de EROs e ERNs nas células incubadas com LPS; entretanto não houve uma diferença significativa entre os resultados após incubação com concentrações crescentes do DEC ou EAT comparados ao controle.

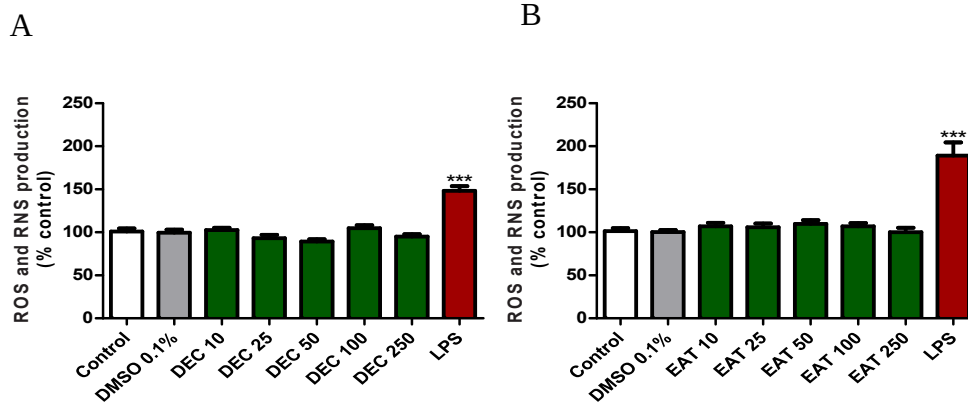


Figura 5. Efeitos da DEC (A) e do EAT (B) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), medida através do ensaio DCFH-DA em células J774A1 após 24 h de incubação. Os valores são expressos como médias \pm EPM de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$ vs. controle

3.2.3 Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O $\Delta\psi_m$ foi avaliado a fim de estabelecer a relação entre a presença do extrato e uma possível alteração negativa em relação à função mitocondrial das células (Fig. 6). O tratamento com DEC ou EAT não promoveu alterações à função mitocondrial.

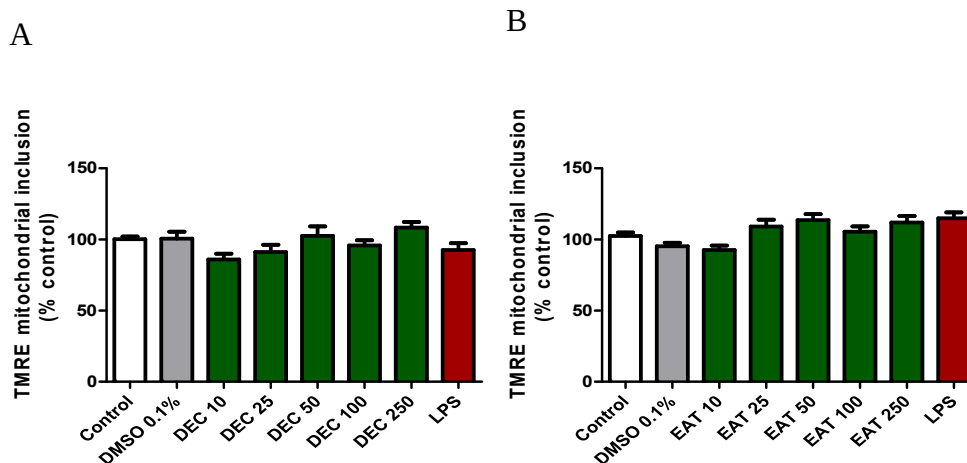


Figura 6: Efeitos do DEC (A) e do EAT (B) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) medido com a adição de TMRE nas mitocôndrias de células J774A1, após 24 h de incubação. Os valores são expressos médias \pm EPM de três experimentos independentes.

3.2.4 Efeitos sobre a produção de óxido nítrico (NO)

O potencial anti-inflamatório foi avaliado através da inibição da produção de NO, estimulada por LPS, na presença do DEC e do EAT (Figura 7). Foi possível observar um aumento da produção de NO nas células incubadas com LPS em relação ao controle e uma diminuição nas células incubadas com o controle positivo AAS (ácido acetilsalicílico) em relação ao LPS. As células incubadas com DEC não apresentaram diferença significativa na produção de NO quando comparadas às células incubadas apenas com LPS; entretanto, quando incubadas com EAT, as células apresentaram uma diminuição na produção de nitritos em todas as concentrações apresentadas.

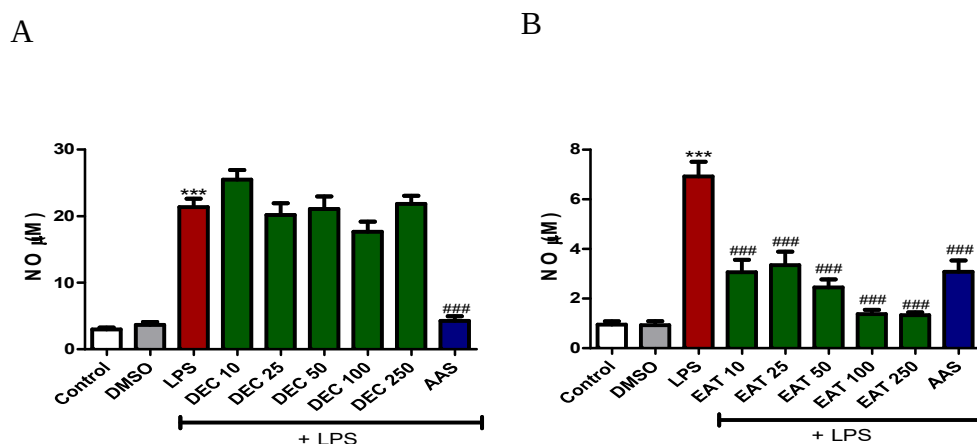


Figura 7: Efeitos do DEC (A) e do EAT (B) sobre a produção de nitritos em células J774A1 estimuladas por LPS após 24h de incubação. Os valores são expressos como médias \pm DPM de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$ vs. controle.

4. Discussão

Neste estudo, foi realizada a elaboração da decocção de *P. cernua* bem como do seu extrato bruto de alcaloides, confirmando a presença de cernuína e licocernuína, dois alcaloides previamente descritos para a espécie na literatura. Ambos os compostos foram isolados a partir do extrato de alcaloides totais, sendo também semi-quantificados nas preparações empregadas nos ensaios *in vitro* a partir do método de CG-EM. O presente estudo foi realizado com base nos diversos relatos do uso popular da espécie, como terapia adjuvante para doenças inflamatórias articulares, buscando analisar a relação dos alcaloides presentes na espécie com uma possível reversão de um quadro inflamatório, visando avaliar o potencial anti-inflamatório do decocto e do extrato de alcaloides como uma possível fonte de novos compostos anti-inflamatórios.

Cernuína e licocernuína pertencem à classe dos alcaloides, cuja denominação se dá pelo fato de apresentarem caráter básico e também pela presença de átomos de nitrogênio, formando combinações cíclicas na maioria das vezes. Os alcaloides de *Lycopodium*, podem ser classificados em quatro diferentes grupos: licopodano, licodano, faucetimano e misto (Ayer e Trifonov, 1994). Desta maneira, esses compostos já foram descritos na literatura como sendo representantes do grupo misto (Ma e Gang, 2004). As estruturas de ambos consistem em um anel tetracíclico presente em um sistema contendo dois átomos de nitrogênio, além de um grupo metila em C-15 (Braekman *et al.*, 1974).

Nos ensaios de citotoxicidade, o decocto não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas, entretanto, o extrato de alcaloides demonstrou toxicidade celular apenas na concentração de 250 µg/mL. Em decorrência da menor quantidade de alcaloides no DEC quando comparado ao EAT, o nível de citotoxicidade foi diretamente influenciado, pois ealcaloides são compostos potencialmente tóxicos (Barbosa-Filho *et al.*, 2006). Acredita-se que a toxicidade de alguns alcaloides desse grupo seja influenciada pela presença de ligações C-N, muitas vezes

decorrente de grupamentos epóxi em C-12 e C-15, além do grupamento *N*-óxido (Zhang *et al.* 2014).

A formação de EROs e ERNs na presença do DEC e EAT não foi alterada em nenhuma das concentrações. Dessa maneira, não foi possível identificar atividade antioxidante ou pró-oxidante nos extratos, bem como não houve danos mitocondriais. Na avaliação da produção de óxido nítrico, nenhuma das concentrações do decocto foi eficaz, de forma que não foi possível validar, pelo menos nas nossas condições experimentais *in vitro*, a atividade anti-inflamatória pela qual é utilizada popularmente a decocção da espécie. Entretanto, o EAT, que possui uma concentração maior de cernuina e licocernuina, apresentou inibição significativa do quadro inflamatório, e proporcional ao aumento da concentração.

Através da análise cromatográfica realizada, foi verificado que, apesar das proporções do alcaloide cernuína serem bastante similares em ambas as preparações empregadas nos ensaios *in vitro* (44.05 % e 46.89 % no EAT e na DEC, respectivamente), a principal diferença seria a concentração de licocernuína, presente em maior quantidade no EAT (42.93%), comparada à decocção (32.89 %). Estruturalmente, a principal diferença entre as moléculas é a presença de uma hidroxila na molécula da licocernuína, sendo esse grupamento responsável por influenciar na atividade anti-inflamatória (Harborne e Williams, 2000), tornando assim, o EAT mais ativo frente a inflamação.

Segundo Konrath *et al.* (2013), após investigações realizadas com os alcaloides de *P. cernua* sobre a inibição da enzima AChE, o extrato de alcaloides contendo cernuína e licocernuína apresentou-se ativo na inibição da mesma (valor de $IC_{50} = 42,6 \mu\text{g/mL}$), sugerindo assim um processo sinérgico entre ambos, entretanto, quando analisados individualmente, apenas a cernuína apresentou-se ativa (valor de $IC_{50} = 32,7 \mu\text{g/mL}$), ao contrário da licocernuína, que apresentou resultados pouco representativos (valor de $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$), demonstrando assim uma maior tendência da atuação da cernuína frente a enzima AChE. Dessa maneira, há a necessidade da realização dos ensaios com os produtos isolados, uma vez que não seria ainda possível concluir que

a cernuína não possui atividade anti-inflamatória e que o efeito do EAT esteja diretamente ligado ao aumento da concentração da licocernuína, que parece ser o metabólito bioativo. Portanto, os ensaios com os compostos puros se tornam necessários para poder corroborar esta hipótese e esclarecer a verdadeira relação entre a presença de cada um dos produtos e a inibição da inflamação.

Em um estudo de Barbosa-Filho, *et al.* (2006), os autores realizaram um levantamento dos alcaloides previamente descritos na literatura entre os anos de 1907 e 2000. O estudo demonstrou mais de 170 alcaloides como compostos potencialmente anti-inflamatórios, sendo que 137 deles tiveram esses dados confirmados. Os alcaloides cernuína e licocernuína não foram citados no estudo, muito em decorrência da ausência de maiores informações de ambos, mas também pelo fato da maior parte dos estudos documentados sobre alcaloides dessa classe estarem relacionados a seu potencial na inibição da enzima AChE (Konrath *et al.*, 2013), entretanto, o fato desses dados ainda não terem sido completamente explorados ou documentados apenas demonstram a importância na realização de mais testes e do interesse em explorar os seus mecanismos.

Estudos anteriormente realizados por Porquis *et al.* (2018) com extratos de *P. cernua* oriundas das Filipinas, demonstraram resultados positivos para atividade anti-inflamatória. Os extratos utilizados foram separados em partes aéreas da planta e raízes da mesma, sendo realizadas investigações fitoquímicas que confirmaram a presença apenas de saponinas e triterpenos. Os testes realizados com o extrato das raízes da planta, apresentando resultados significativamente menores quando comparados às partes aéreas. Nesse estudo, o método de extração também envolveu um solvente orgânico, apresentando produtos em quantidades mais relevantes do que as encontradas no decocto. Além da atividade demonstrada pelas partes aéreas da planta, outro ponto importante a ser levado em consideração é o fato de que nenhum dos extratos apresentou alcaloides em sua composição, sugerindo que, mesmo o extrato de alcaloides ter demonstrado o potencial desejado, o efeito anti-inflamatório pode não ser decorrente exclusivamente dos alcaloides, mas sim, do conjunto de componentes presentes na planta. .

5. Conclusão

Tanto a decocção como o extrato de alcaloides obtidos de *Palhinhaea cernua* mostraram a presença de dois alcaloides já relatados e identificados como cernuína e licocernuína. O decocto não apresentou atividade potencial anti-inflamatório, motivo pelo qual é empregado popularmente, porém ainda assim não demonstrou nenhum grau de toxicidade in vitro, dessa forma o seu uso popular parece ser considerado seguro. O extrato de alcaloides demonstrou uma potencial citotoxicidade; entretanto, o mesmo demonstrou significativo potencial anti-inflamatório em concentrações não citotóxicas. A partir dos dados obtidos, inicia-se a busca de maiores informações a respeito do potencial uso dos alcaloides isolados, além da possível diferença de atividade entre ambos.

6. Referências Bibliográficas

- Alderman, M. H., Cohen, H., Madhavan, S., Kivlighn, S., 1999. Serum Uric Acid and Cardiovascular Events in Successfully Treated Hypertensive Patients, *Hypertension*, 34, 144-150.
- Akkol, E.K., 2012. New Strategies for Anti-Inflammatory Drug Development. *Journal of Pharmacogenomic and Pharmacoproteomics*, Vol. 3, 118.
- Arbo, M.D., Silva, R., Barbosa, D.J., Dias da Silva, D., Rossato, L.G., Bastos, M.L., Carmo, H., 2014. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast H9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicology Letters*, 229, 178–189.
- Ayer, W.A., Trifonov, L.S., 1994. The *Lycopodium* alkaloids. In: BROSSI, A. (Ed.), *The Alkaloids*, v. 45. New York: Academic Press, p. 233-266.
- Barbosa-Filho, J.M., Piuvezam, M.R., Moura, M.D., Silva, M.S., Lima, K.V.B., Leitão da-Cunha, E.V., Fechine, I.M., Takemura, O.S, 2006. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (1), 109-139.

- Birri, M., Vallejoa, M., Juaréz, M.C., Agnese, A.M., 2017. Aphrodisiac activity of *Phlegmariurus saururus* in copulating and non copulating male rats; *Phytomedicine*, 24, 104-110.
- Braekman, J.C., Nyembo, L., Bourdoux, P., Hootelf C., 1974. Distribution des alcaloides dans le genre *Lycopodium*. *Phytochemistry* 13 (11), 2519–2528.
- Cambie, R.C., Ash, J., 1994. Fijian medicinal Plants. CSIRO Australia. *Journal of Natural Products* 59, 1216-1217.
- Chou, R., Helfand, M., Peterson, K., Dana, T., Roberts, C., 2006. Drug Class Review on Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitors and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). Portland: Oregon Health & Science University.
- Chuong, N.N, Trung, B.H., Luan, T.C., Hung, T.M., Dang, N.H., Dat, N.T., 2014. Anti-amnesic effect of alkaloid fraction from *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. On scopolamine induced memory impairment in mice. *Neuroscience Letters*, 575, 42–46.
- Dias da Silva, D., Carmo, H., Silva, E., 2013a. The risky cocktail: what combination effects can we expect between ecstasy and other amphetamines? *Archives of Toxicology*, 87, 111–122.
- Dias da Silva, D., Silva, E., Carmo, H., 2013b. Cytotoxic effects of amphetamine mixtures in primary hepatocytes are severely aggravated under hyperthermic conditions. *Toxicology In Vitro* 27, 1670–1678.
- Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2011, 1ª edição.
- Gil, Ã., 2002. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(8), 388–396.
- Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editors), 2004. *Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables*. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands / Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands / CTA, Wageningen, Netherlands. 668 pp.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.

- Ho, R., Marsousi, N., Eugster, P., Bianchini, J.P., Raharivelomanana, P., 2009. Detection by UPLC/ESI-TOF-MS of alkaloids in three Lycopodiaceae species from French Polynesia and their anticholinesterase activity. *Natural Products Communications*, 10, 1349.
- He, L.Z., Huang, Z.H., Wang, H.R., Tu, D.Y., Mao, Z.F., 1998. *Shenjincao (Palhinhaea cernua)* injection for treatment of experimental silicosis of rats, *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 50, 351-354.
- Jiao, R.H., Hui, M.G., Shi, D.H., Tan, R.X., 2006. An Apigenin-Derived Xanthine Oxidase Inhibitor from *Palhinhaea cernua*. *Journal of Natural Products*, 69, 1089-1091.
- Konrath, E.L., Ortega, M.G., Bordignon, S.L., Apel, M.A., Henriques, A.T., Cabrera, J.L., 2013. Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American Lycopodiaceae species, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, 218-222.
- Lichtenstein, D.R., Syngal, S., Wolfe, M.M., 1995. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 38, 5-18.
- Ma, X., Gang, D.R., 2004. The Lycopodium alkaloids, *Natural Products Reports*, 21, 752-772.
- Ma, X., Gang, D.R., 2008. In vitro production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 69, 2022-2028.
- Malkinson, F.D., 1982. Colchicine: new uses of an old, old drug. *Archives Dermatology* 11, 453-457.
- Mandal, S.K., Biswas, R., Bhattacharyya, S.S., Paul, S., Dutta, S., Pattak, S., Khuda-Buksh, A.R., 2010. Lycopodine from *Lycopodium clavatum* extract inhibits proliferation of HeLa cells through induction of apoptosis via caspase-3 activation. *European Journal of Pharmacology*, 626 (2-3), 115-122.
- McKellar, G., Madhok, R., Singh, R., 2007. The problem with NSAIDs: what data to believe? *Current Pain Headache Reports*, 11, 423-427.
- Moncada, S., Ferreira, H.S., Vane, J.R., 1973. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the edema of inflammation. *Nature*, 246, 217-219.

- Morel, S., Kerzaon, I., Roumy, V., Azaroual, N., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F., Hennebelle, T., 2012. A new cernuane-type alkaloid from *Lycopodium cernuum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 45, 188–190.
- Morita, H., Hirasawa, Y., Shinzato, T., Kobayashi, J.I., 2004. New phlegmarane-type, cernuane-type, and quinolizidine alkaloids from two species of *Lycopodium*; *Tetrahedron*, 60, 7015-7023.
- Nathan, C., Ding, A., 2010. Nonresolving inflammation. *Cell*, 140, 871–82.
- Nemes, Z., Dietz, R., Lüth, J.B., Gomba, S., Hackenthal, E., Gross, F., 1979. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red; *Experientia* 35 (11), 1475–1476.
- Pederson, J.A., Ollgaard, B., 1982. Phenolic acids in the genus *Lycopodium*; *Biochemical Systematic and Ecology*, 10 (1,20), 3-9.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2010. English Edition, vol 1. People's Medical Publishing House, Beijing.
- Porquis, H.C., Ang, A.M.G., Doblas, G.Z., Amoroso, V.B., Jacalan, D.R.S, Batbatan, C.G., Dela Cruz, R.Y, 2018. Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Studies on *Lycopodiella cernua* (L.) J. Sm. in Bukidnon, Philippines. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 7 (2), .
- Rao, K.M., Padmanabhan, J., Kilby, D.L., Cohen, H.J., Currie, M.S., Weinberg, J.B., 1992. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor, *Journal of Leukocyte Biology*. 51, 496–500.
- Robbins, S.L., *Fundamentos de Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 2° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 3 p. 22-34.
- Russo, D., Valentão, P., Andrade, P.B., Fernandez, C., Milella L., 2015. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and anticholinesterase activities of *Smallanthus sonchifolius* landraces and

- correlation with their phytochemical profiles, *International Journal of Molecules Science*, 16, 17696–17718.
- Scaduto, R.C. Jr, Grotyohann, L.W., 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives, *Biophysical Journal*, 76 (1 Pt 1), 469–477.
- Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end, *Nature Immunology*, 6, 1191–1197.
- Sobota, R., Szwed, M., Kasza, A., Bugno, M., Kordula, T., 2000. Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267,329–333 .
- Stehlé, H., Stehlé, M., 1962. Flore Agronomique des Antilles Françaises. In: Flore des Légumineuses et anti-érosion-Imprimerie officielle Basse-Terre-Guadeloupe, vol. III, p. 184.
- Tang, X.C., Han, Y.F., Chen, X.P. and Zhu, X.D., 1986. Effects of huperzine-A on learning and the retrieval process of discrimination performance in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 7, 507-511.
- Vane, J.R., 1976. The mode of action of aspirin and similar compounds, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 58, 691-712.
- Zhang, J.J., Guo, Z.J., Pan, D.J., et al., 1997. Constituents from *Palhinhaea cernua*. *Zhongcaoyao* 30 (3), 139–140.
- Zhang, Z., Hala, N., Melissa, R.J., Pasco, D.S., Walker, L.A., Clark, A.M., 2002. Natural Products Inhibiting *Candida albicans* Secreted Aspartic Proteases from *Lycopodium cernuum*. *Journal of Natural Products*, 65, 979-985.
- Zhang, D.B., Chen, J.J., Zhang, L., Song, Q.Y., Gao, K., 2014. Bioactive alkaloids from *Palhinhaea cernua*, *Phytochemistry Letters* 10, 76–79.

ANEXO 1



JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.2
●	Impact Factor	p.2
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0378-8741

DESCRIPTION

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

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

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

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

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

AUDIENCE

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

IMPACT FACTOR

2017: 3.115 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

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

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

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

Associate Editor:

P. Dias Fernandes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
T. Efferth, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, Germany
L.D. Kong, Nanjing University, Nanjing, China
V. Kuete, University of Dschang, Bafoussam, Cameroon
M. Leonti, Università di Cagliari, Cagliari, Italy
G. Lin, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China
P.K. Mukherjee, Jadavpur University, Kolkata, India
K. Shaari, University Putra Malaysia, Selangor, Malaysia
A. Shikov, Saint Petersburg Institute of Pharmacy, Kuzmolovo P 245, Russian Federation
M. Ye, Peking University, Beijing, China
E. Yesilada, Yeditepe University, Erenkoy-Istanbul, Turkey

Reviews Editor (including Commentaries and Book Reviews):

M. Heinrich, UCL School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK

Managing Editor:

B. Pomahacova, De NatuurApotheek, Pijnacker, Netherlands
I. Vermaak, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa
M. Sandasi, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa
L.J. McGaw, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

Editorial Board:

S. Alban, Kiel, Germany
A. Andrade-Cetto, CD México, Mexico
M.J. Balick, Bronx, New York, USA
R. Bauer, Graz, Austria
G. Bourdy, Cayenne, French Guiana
T. Brendler, Collingswood, New Jersey, USA
J.B. Calixto, Florianópolis, Brazil
D. C. Chattopadhyay, Kolkata, India

C-T. Che, Hong Kong, Hong Kong
G.A. Cordell, Chicago, Illinois, USA
V.S. da Silva Bolzani, Araraquara, Brazil
J. Ding, Shanghai, China
V.M. Dirsch, Vienna, Austria
E. Elisabetsky, Porto Alegre, Brazil
J. Fleurentin, Metz, France
B.L. Furman, Glasgow, UK
S. Gafner, Austin, Texas, USA
M.P. Germano, Messina, Italy
J. Gertsch, Bern, Switzerland
A.H. Gilani, Karachi, Pakistan
M.P. Gupta, Panama City, Panama
M. H. Halabalaki, Athens, Greece
A. Hensel, Münster, Germany
P.J. Houghton, London, UK
Z. Ismail, Penang, Malaysia
W. Jia, Hawaii, USA
T. Johns, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, Canada
C.K. Katiyar, Kolkata, India
G. Kavalali, Istanbul, Turkey
H-S. Kim, Cheongju, The Republic of Korea
J. Kim, Seoul, The Republic of Korea
Y. Kimura, Ehime, Japan
A. K. Kiss, Warsaw, Poland
M.A. Lacaille-Dubois, Dijon, France
Clara B. S. Lau, Shatin, Hong Kong
H Li, Beijing, China
A. Lu, Hong Kong, China
T. M. Makino, Nagoya, Japan
E. Matteucci, Pisa, Italy
I. Merfort, Freiburg, Germany
J.J.M. Meyer, Pretoria, South Africa
D.E. Moerman
D.A. Mulholland, Guildford, England, UK
M. R. Mustafa, Kuala Lumpur, Malaysia
A. Panthong, Chiang Mai, Thailand
B. Patwardhan, Pune, India
X. Peigen, Beijing, China
A. Pieroni, Pollenzo/Bra, Italy
G. Schmeda Hirschmann, Talca, Chile
D.D. Soejarto, Chicago, Illinois, USA
E. Speroni, Bologna, Italy
C. G. L. Veale, Pietermaritzburg, South Africa
A.J. Vlietinck, Antwerpen, Belgium
H. Wagner, München, Germany
C.S. Weckerle, Zurich, Switzerland
C.W. Wright, Bradford, England, UK
R. Yan, Macau, China
A.T. Yenesew, Nairobi, Kenya
S. Zacchino, Rosario, Argentina

Founding Editors:

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

Previous Editors-in-Chief

R. Verpoorte, Universiteit Leiden, RA Leiden, Netherlands

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

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

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

Classification of your paper

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

The "rules of 5"

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

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

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

Types of paper

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

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the

papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

Submission checklist

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

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Policy and ethics

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

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

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

Author contributions

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

Declaration of interest

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

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

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

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

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

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

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

Creative Commons Attribution (CC BY)

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

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

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

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

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

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

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

Additional information

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

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

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

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

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

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

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

PREPARATION

Peer review

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

Use of word processing software

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

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Glossary

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

Appendices

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

Essential title page information

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

Abstract

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

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

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

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

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

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

Plant names

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

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Math formulae

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

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

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

Color artwork

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

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference links

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

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

Data references

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

Reference management software

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

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

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

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

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

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

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

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

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

Supplementary material

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

Research data

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

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

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

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

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

Mendeley Data

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

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

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

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

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

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).