

CURSO DE FARMÁCIA

Jéssica Weizemann

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTITUMORAL DE *Citrus reticulata* BLANCO**

Santa Cruz do Sul

2016

Jéssica Weizemann

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTITUMORAL DE *Citrus reticulata* BLANCO**

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Chana de Medeiros da Silva

Santa Cruz do Sul

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio prestado durante a minha graduação. À minha mãe, em especial, que não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos e representa a razão de todo meu esforço e dedicação.

Aos meus amigos Caroline, Douglas, Leticia e Rafaela por compartilhar os melhores e piores momentos vividos, com toda certeza o caminho percorrido até aqui foi mais alegre e especial na presença de vocês.

À minha orientadora Chana de Medeiros da Silva pelo auxílio prestado na realização deste trabalho, também pela paciência, confiança e conhecimento transmitidos.

Aos demais amigos e colegas do Curso de Farmácia que tive a oportunidade de conviver. Aos meus professores por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à Jessica do Laboratório de Ensino de Farmácia, à Valéria do TecnoUNISC e à Michele do Laboratório de Cromatografia pela disposição em ajudar no que fosse possível durante a realização das práticas deste trabalho. Aos bolsistas dos laboratórios e novamente à Leticia por toda ajuda prestada.

Ao Laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela colaboração e à Edileuza pela disponibilidade em me ajudar a realizar o ensaio da atividade antitumoral.

A todos aqueles que estiveram e estão presentes nesta trajetória.

RESUMO

A espécie *Citrus reticulata* Blanco, representada por muitas variedades e híbridos, é constituída de compostos fenólicos, principalmente flavonoides da classe das flavanonas glicosídicas. Os flavonoides são um grupo de compostos polifenólicos de grande destaque e vêm demonstrando diversas atividades farmacológicas, podendo citar seu potencial antitumoral. A partir disso, este trabalho teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais presentes em *C. reticulata*, bem como realizar a avaliação *in vitro* do seu potencial antitumoral. Os extratos das cascas e polpas de duas variedades de *C. reticulata*, Comum e Poncã, e o híbrido Murcote foram obtidos através de banho de ultrassom e posteriormente liofilizados. A análise quantitativa de compostos fenólicos foi realizada por meio de ensaios espectrofotométricos e os resultados obtidos através de curva de calibração utilizando o padrão correspondente. A atividade antitumoral foi determinada por meio do ensaio de MTT para medir as células viáveis, frente à linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), submetida a diferentes concentrações dos extratos (50 a 1000 µg/mL). O conteúdo de fenóis totais variou de 121,59 a 144,12 mg EAG/g para os extratos das polpas e de 166,62 a 173,70 mg EAG/g para os extratos das cascas. O teor de flavonoides totais variou de 10,01 a 23,7 mg ER/g e de 69,9 a 118,59 mg ER/g para os extratos das polpas e cascas, respectivamente. Todos os extratos reduziram a porcentagem de células viáveis na concentração de 50 µg/mL, no entanto, apenas a polpa da bergamota Poncã e a polpa do híbrido Murcote mantiveram a viabilidade celular reduzida nas concentrações subsequentes de extrato avaliadas. Tanto as cascas das variedades testadas, bem como a polpa da bergamota Comum apresentaram fraco poder inibitório. É possível concluir que a espécie estudada é fonte abundante de compostos fenólicos e flavonoides, porém demonstrou-se que as maiores concentrações de extrato avaliadas, bem como os extratos com maior teor de compostos fenólicos e flavonoides não apresentaram o efeito antiproliferativo esperado.

Palavras-chave: *Citrus reticulata*, compostos fenólicos, flavonoides, atividade antitumoral.

ABSTRACT

The *Citrus reticulata* Blanco species, represented by many varieties and hybrids, consists of phenolic compounds, mainly flavonoids of the class of glycosidic flavanones. Flavonoids are a group of polyphenolic compounds of great prominence and have been demonstrating diverse pharmacological activities, being able to cite its antitumoral potential. From this, the objective of this work was to determine the total phenolic compounds and total flavonoids present in *C. reticulata*, as well as to perform the *in vitro* evaluation of its antitumor potential. The extracts of the bark and pulp of two varieties of *C. reticulata*, Comum and Poncã, and the Murcote hybrid were obtained through an ultrasonic bath and subsequently lyophilized. The quantitative analysis of phenolic compounds was performed by means of spectrophotometric tests and the results obtained through a calibration curve using the corresponding standard. Antitumor activity was determined by the MTT assay to measure viable cells against A549 line (human lung adenocarcinoma), submitted to different concentrations of the extracts (50 to 1000 µg/mL). The content of total phenols ranged from 121.59 to 144.12 mg GAE/g for the pulp extracts and from 166.62 to 173.70 mg GAE/g for the peel extracts. Total flavonoid content ranged from 10.01 to 23.7 mg RE/g and from 69.9 to 118.59 mg RE/g for pulp and peel extracts, respectively. All extracts reduced the percentage of viable cells at the concentration of 50 µg/mL, however, only the Ponca bergamot pulp and the Murcote hybrid pulp maintained the reduced cell viability at the subsequent extract concentrations evaluated. The peels of the tested varieties, as well as the common bergamot pulp presented weak inhibitory power. It is possible to conclude that the studied species is an abundant source of phenolic compounds and flavonoids, but it was demonstrated that the higher concentrations of extract evaluated, as well as the extracts with higher content of phenolic compounds and flavonoids did not present the expected antiproliferative effect.

Key words: *Citrus reticulata*, phenolic compounds, flavonoids, antitumor activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos específicos.....	Erro! Indicador não definido.
3 REFERENCIAL TEÓRICO	Erro! Indicador não definido.
3.1 <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	Erro! Indicador não definido.
3.1.1 Gênero <i>Citrus</i>	Erro! Indicador não definido.
3.1.2 Dados botânicos e fenológicos.....	Erro! Indicador não definido.
3.1.3 Composição fitoquímica	Erro! Indicador não definido.
3.1.4 Propriedades farmacológicas	Erro! Indicador não definido.
3.2 Compostos fenólicos	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Flavonoides	Erro! Indicador não definido.
3.3 Câncer.....	Erro! Indicador não definido.
3.3.1 Câncer de pulmão	Erro! Indicador não definido.
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
4.1 Tipo de estudo.....	Erro! Indicador não definido.
4.2 Local de estudo	Erro! Indicador não definido.
4.3 Material vegetal	Erro! Indicador não definido.
4.4 Obtenção dos extratos	Erro! Indicador não definido.
4.5 Análise quantitativa de compostos fenólicos	Erro! Indicador não definido.
4.5.1 Determinação do conteúdo de fenóis totais	Erro! Indicador não definido.
4.5.2 Determinação do conteúdo de flavonoides totais	Erro! Indicador não definido.
4.6 Avaliação da atividade antitumoral	Erro! Indicador não definido.
4.7 Análises estatísticas	Erro! Indicador não definido.
5 ARTIGO.....	Erro! Indicador não definido.
6 CONCLUSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS.....	9
ANEXOS	16
ANEXO A – Normas de publicação para a Revista Brasileira de Plantas Mediciniais	16

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo as plantas têm sido utilizadas no tratamento de um amplo espectro de doenças. Desde o início de 1800, os avanços no conhecimento científico levaram à descoberta de compostos bioativos, denominados produtos naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014). Os produtos naturais são as principais fontes de diversidade de matérias-primas. Um grande número de compostos derivados de produtos naturais encontra-se em diversos estágios de desenvolvimento clínico, indicando o seu uso como fonte viável a candidatos de novos fármacos (MISHRA; TIWARI, 2011).

Citrus é um dos gêneros que compreende as frutas mais importantes do mundo, além de ser amplamente consumido principalmente como produtos frescos ou suco, devido ao seu valor nutritivo e sabor especial (ABEYSINGHE et al., 2007). Os frutos cítricos abrangem diversos tipos de laranjas, bem como tangerinas, tangors e tangelos, onde cada uma dessas espécies ou híbridos tem uma ou mais variedades (PETERSON et al., 2006a). Importantes fontes de vitamina C e outros compostos de promoção da saúde são fornecidos por este gênero (WU et al., 2014). Os principais componentes bioativos dos frutos cítricos, os polifenóis e os terpenos, são constantemente apontados por intervir nos processos de desenvolvimento do câncer (BÉLIVEAU; GINGRAS, 2007).

Compostos fenólicos representam um grupo muito diversificado de componentes bioativos amplamente distribuídos em plantas, como frutas, legumes e chás (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011). Entre os mais importantes e diversificados compostos fenólicos, tem-se os flavonoides, presentes abundantemente entre os metabólitos secundários dos vegetais (SIMÕES et al., 2010). Há muitas evidências de que estes compostos têm efeitos importantes na inibição da carcinogênese. O papel dos flavonoides da dieta na prevenção do câncer é amplamente discutido. A alta ingestão de flavonoides presentes em frutas e legumes pode estar associada com uma baixa prevalência de câncer em seres humanos (REN et al., 2003).

O câncer se manifesta em diversas formas, todas caracterizadas pela livre proliferação das células. Atualmente, existem muitas técnicas eficazes para o tratamento do câncer, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Porém, as células tumorais tendem a se adaptar ao tratamento, podendo sofrer mutação. Além disso, a quimioterapia ocasiona diversos efeitos adversos, trazendo um comprometimento na

qualidade de vida dos pacientes. O câncer está entre os problemas médicos mais relevantes que afligem a população humana e estratégias de quimioprevenção representam uma abordagem promissora na redução da sua incidência e mortalidade (CHEN; CHEN, 2013).

Há várias décadas, o câncer de pulmão tem sido o mais comum de todas as neoplasias, além de representar a causa mais comum de morte por câncer (HUDLER; KOCEVAR; KOMEL, 2014). Mundialmente, sua incidência para o ano de 2012 foi de 1,82 milhões de novos casos, sendo mais comum entre os homens. Já no Brasil, foi responsável por 24.490 mil mortes no ano de 2013, com estimativa de cerca de 28 mil novos casos em 2016. Estima-se que, anualmente, sua incidência aumente em 2%. No entanto, no final do século passado, o câncer de pulmão tornou-se uma das principais causas de morte evitáveis (INCA, 2016).

A espécie *Citrus reticulata* Blanco, conhecida principalmente como tangerina, mandarina ou bergamota, é uma das mais aromáticas e prazerosas frutas para consumo *in natura*, sendo diferenciada dos demais cítricos pela facilidade com que sua casca se desprende da polpa (SILVA; TASSARA, 2005). Como resultado do grande consumo, sua produção global para 2014/15 foi estimada em 27,1 milhões de toneladas, considerado um recorde de produção (USDA, 2015). Além de a espécie ser constituída de compostos fenólicos, representados principalmente por flavonoides da classe das flavanonas glicosídicas, há diversos relatos das suas propriedades medicinais, incluindo a atividade antitumoral (DU; CHEN, 2010; ZHANG et al., 2014a).

Avanços nas pesquisas do câncer têm tido muito sucesso durante a última década. Contudo, infelizmente, o número de novos casos cresce em um ritmo acelerado, sendo fundamental a pesquisa na luta contra o câncer (KHAN; HUMA, DANGLES, 2014). A utilização de fitoquímicos para a prevenção e cura de doenças são bem conhecidas (KUMAR; PANDEY, 2013). Os flavonoides cítricos têm demonstrado diversas atividades farmacológicas, podendo citar seu potencial antitumoral, o qual está relacionado à toxicidade seletiva, ação antiproliferativa e apoptótica sobre as células cancerosas, inibindo os processos de indução, promoção e proliferação da carcinogênese (TRIPOLI et al., 2007).

Tendo em vista a importância de pesquisas acerca dos constituintes ativos das plantas, bem como a necessidade da busca por novas alternativas eficazes de prevenção e terapia do câncer, torna-se importante analisar a espécie *C. reticulata*

Blanco quanto à sua composição e propriedade farmacológica. A partir disso, este trabalho teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais presentes em *C. reticulata*, bem como realizar a avaliação *in vitro* do seu potencial antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B. et al. Polyphenolic contents in *Citrus* fruit juices: authenticity assessment. *European Food Research and Technology*, v. 238, sn., p. 803-818, 2014.
- ABEYSINGHE, D. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, v. 104, sn., p. 1338-1344, 2007.
- AKTIPIS, C. A.; NESSE, R. M. Evolutionary foundations for cancer biology. *Evolutionary Applications*, v. 6, sn., p. 144-159, 2013.
- ALBERG, A. J. et al. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, v. 143, n. 5, 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society, 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/index>>. Acesso em Set de 2015.
- BANJERDPONGCHAI, R. et al. Hesperidin from *Citrus* seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways. *Tumor Biology*, sv., sn., p. 1-11, 2015.
- BARROSO, G. M. et al. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Rio de Janeiro: LTC, c1978-1986. 4 v.
- BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. *Os alimentos contra o câncer: a prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação*. Petrópolis: Vozes, 2007. 214 p.
- BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BUNN, P. A. Worldwide Overview of the Current Status of Lung Cancer Diagnosis and Treatment. *Archives Pathology Laboratory Medicine*, v. 136, sn., p. 1478-1481, 2012.
- CAPELOZZI, V. L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 4, p. 375-382, 2009.
- CHANG, L. et al. Ougan (*Citrus reticulata* cv. *Suavissima*) flavedo extract suppresses cancer motility by interfering with epithelial-to-mesenchymal transition in SKOV3 cells. *Chinese Medicine*, v. 10, n. 14, 2015.

- CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, v. 138, sn., p. 2099-2107, 2013.
- CHINAPONGTITIWAT, V. et al. Important flavonoids and limonin in selected Thai citrus residues. *Journal of Functional Foods*, v. 5, sn., p. 1151-1158, 2013.
- CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, sn., p. 777-780, 2009.
- COELHO, R. I. et al. Caracterização morfológica da planta, frutos, sementes e plântulas de tangerina (*Citrus reticulata* L.) de ocorrência natural no sul do estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 23, n. 2, p. 294-301, 2001.
- COSTA, J. F. O. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. *Journal of Natural Products*, v. 77, sn., p. 703-723, 2014.
- CRUZ, M. C. M.; MOREIRA, R. A.; ARAÚJO, N. A. Rentabilidade da tangerineira 'Ponkan' submetida ao raleio químico comparada com ao manejo convencional. *Revista Brasileira de Fruticultura*, São Paulo, v. especial, sn., p. 447-454, 2011.
- DEMARIA, S. et al. Cancer and inflammation: Promise for biological therapy. *Journal of Immunotherapy*, v. 33, n. 4, p. 335-351, 2010.
- DU, Q.; CHEN, H. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food Chemistry*, v. 119, sn., p. 567-572, 2010.
- FIELD, J. K. et al. Prospects for population screening and diagnosis of lung cancer. *Lancet*, v. 382, sn., p. 732-741, 2013.
- GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of *Citrus* juices. *Molecules*, v. 12, sn., p. 1641-1673, 2007.
- GOLDSTRAW, P. et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet*, v. 378, sn., p. 1727-1740, 2011.
- HAYAT, K. et al. Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, v. 73, sn., p. 371-376, 2010.
- HO, S.-C.; LIN, C.-C. Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory activity of citrus fruit (*Citrus reticulata*) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 17, p. 7976-7982, 2008.

- HUANG, Y. S.; HO, S. C. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*, v. 119, sn., p. 868-873, 2010.
- HUDLER, P.; KOCEVAR N.; KOMEL R. Proteomic Approaches in Biomarker Discovery: New Perspectives in Cancer Diagnostics. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.
- HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, sn., p. 877-885, 2012.
- IGNAT, I.; VOLFF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, sn., p. 1821-1835, 2011.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer - BRASIL. Carcinoma de Pulmão de Células não Pequenas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 4, p. 485-492, 2002.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer - BRASIL. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 127 p.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer - BRASIL. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>>. Acesso em Set de 2016.
- IWASE, Y. et al. Cancer chemopreventive activity of 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4' – heptamethoxyflavone from the peel of citrus plants. *Cancer Letters*, v. 163, sn., p. 7-9, 2001.
- JUNG, K. H. et al. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by *Citrus reticulata* extract in RAW 264.7 macrophage cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, sn., p. 1545-1550, 2007.
- KANG, S. A. et al. Citri Reticulatae Viride Pericarpium extract induced apoptosis in SNU-C4, human colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, sn., p. 231-235, 2005.
- KHAN, M. K. et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, v. 119, sn., p. 851-858, 2010.
- KHAN, M. K.; HUMA, Z.-E.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 33, sn., p. 85-104, 2014.
- KIM, M.-J. et al. *Citrus reticulata* Blanco induces apoptosis in human gastric cancer cells SNU-668. *Nutrition and Cancer*, v. 51, n. 1, p. 78-82, 2005.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, sn., 2013.

- LEE, H. J. et al. Hesperidin, a popular antioxidant inhibits melanogenesis via Erk1/2 mediated MITF degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, sn., p. 18384-18395, 2015.
- MA, Y. et al. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, sn., p. 227-232, 2008.
- MA, Y-Q. et al. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 16, sn., p. 57-62, 2009.
- MAK, N. K. Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*. *Life Sciences*, v. 58, n. 15, p. 1269-1276, 1996.
- MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, v. 66, sn., p. 2399-2407, 2005.
- MEHMOOD, F. et al. A comparative study of *in vitro* total antioxidant, *in vivo* antidiabetic and antimicrobial activities of essential oils from leaves and rind of *Citrus reticulata* Blanco cv. Murcot (Honey). *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, n. 5, p. 1571-1576, 2013.
- MENDONÇA, V.; GUERRA, A. G. *Cultura dos citros: Plantio à comercialização*. Natal: Clube de Autores, v. 1, 2012. 123 p.
- MIMEAULT, M.; BATRA, K. S. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, v. 23, n. 2, p. 234-254, 2014.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, sn., p. 4769-4807, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, sn., p. 55-63, 1983.
- MOULEHI, I. et al. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, v. 39, sn., p. 74-80, 2012.
- NICOLOSI, E. et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, sn., p. 1155-1166, 2000.
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, sn., p. 418-425, 2001.

- OLLITRAULT, P. et al. SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the *Citrus* genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics*, v. 13, n. 13, 2012.
- PALAZZOLO, E.; LAUDICINA, V. A.; GERMANÀ, M. A. Current and potential use of *Citrus* essential oils. *Current Organic Chemistry*, v. 17, sn., p. 3042-3049, 2013.
- PANIGRAHI, P. et al. Deficit irrigation scheduling and yield prediction of 'Kinnow' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in a semiarid region. *Agricultural Water Management*, v. 140, sn., p. 48-60, 2014.
- PARK, K.-I. et al. Flavonoids identified from Korean *Citrus aurantium* L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, v. 7, sn., p. 287-297, 2014.
- PETERSON, J. J. et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, sn., p. 66-73, 2006a.
- PETERSON, J. J. et al. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, sn., p. 74-80, 2006b.
- PIO, R. M. et al. Características da variedade Fremont quando comparadas com as das tangerinas 'Ponkan' e 'Clementina Nules'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n. 2, p. 222-226, 2006.
- RAVISHANKAR, D. et al. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, sn., p. 2821-2831, 2013.
- RECK M. et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *Lancet*, v. 382, sn., p. 709-19, 2013.
- REN, W. et al. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, v. 23, n. 4, p. 519-534, 2003.
- RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, sn., p. 31-63, 2006.
- RIO, R. G. W. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- RISS, L. T. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- ROSELL, T.; BIVONA, T. G.; KARACHALIOU, N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet*, v. 382, sn., p. 720-731, 2013.

- SILVA, S.; TASSARA, H. *Frutas Brasil frutas*. São Paulo: Empresa das Artes, 2005. 321 p.
- SILVA, S. R. et al. Qualidade e maturação de tangerinas e seus híbridos em São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, n. 4, p. 977-986, 2009.
- SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010.
- SINGLETON, V. L. ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, v. 299, sn., p.152-178, 1999.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 3. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2012.
- STUETZ, W. et al. Polymethoxylated flavones, flavanone glycosides, carotenoids, and antioxidants in different cultivation types of tangerines (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) from Northern Thailand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, sn., p. 6069-6074, 2010.
- SUN, Y. et al. Simultaneous determination of flavonoids in different parts of *Citrus reticulata* 'Chachi' fruit by high performance liquid chromatography—photodiode array detection. *Molecules*, v. 15, sn., p. 5378-5388, 2010.
- TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, v. 153, sn., p. 265-271, 2014.
- THILAKARATHNA, S. H.; RUPASINGHE, H. P. V. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, v. 5, sn., p. 3367-3387, 2013.
- TRIPOLI, E. et al. *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, v. 104, sn., p. 466-479, 2007.
- USDA, United States Department of Agriculture. Citrus: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service, 2015. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Acesso em Out de 2015.
- VOLLMERHAUSEN, T. L. et al. Decoctions from *Citrus reticulata* Blanco seeds protect the uroepithelium against *Escherichia coli* invasion. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, sn., p. 770-774, 2013.
- WANG, Y. C.; CHUANG, Y. C.; HSU, H. W. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, v. 106, sn., p. 277-284, 2008.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington, D.C.: World Cancer Research Fund, 2007. 517 p.

WU, G. A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, v. 32, n.7, p. 656-662, 2014.

XI, W. et al. Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, v. 52, sn., p. 466-474, 2014.

XU, G. et al. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, v. 106, sn., p. 545-551, 2008.

XU, R. et al. Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 *in vitro*. *Food Chemistry*, v. 138, sn., p. 48-53, 2013.

XU, J.-J. et al. Antiviral activity of polymethoxylated flavones from "Guangchenpi", the edible and medicinal pericarps of *Citrus reticulata* 'Chachi'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, sn., p. 2182-2189, 2014.

YE, X.-Q. et al. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, v. 124, sn., p. 1561-1566, 2011.

YUN, Z. et al. Comparative proteomics analysis of differentially accumulated proteins in juice sacs of ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during postharvest cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 56, sn., p. 189-201, 2010.

ZHANG, Y. et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, v. 145, sn., p. 674-680, 2014a.

ZHANG, J. et al. Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. Suavissima) fruit against cancer cell proliferation and migration. *Journal of Functional Food*, v. 10, sn., p. 511-519, 2014b.

ZHOU, X.-M. et al. Inhibitory effects of alkaline extract of *Citrus reticulata* on pulmonary fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 146, sn., p. 372-378, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Normas de publicação para a Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

INSTRUÇÕES AOS AUTORES



ISSN 1516-0572 versão impressa
ISSN 1983-084X versão on-line

Escopo e política

A Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - RBPM é publicação trimestral, exclusivamente eletrônica a partir de 2012, e destina-se à divulgação de trabalhos científicos originais, revisões bibliográficas, e notas prévias, que deverão ser inéditos e contemplar as grandes áreas relativas ao estudo de plantas medicinais. Manuscritos que envolvam ensaios clínicos deverão vir acompanhados de autorização da Comissão de Ética pertinente para realização da pesquisa. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol, sendo obrigatória a apresentação do resumo em português e em inglês, independente do idioma utilizado. Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm.sbp@gmail.com, com letra Arial 12, espaço duplo, margens de 2 cm, em "Word for Windows". Os artigos, em qualquer modalidade, não devem exceder 20 páginas. No e-mail, enviar telefone para eventuais contatos urgentes.

Para a publicação, os artigos aprovados submetidos à RBPM a partir de 1º de Abril de 2013 (inclusive), terão custo de tramite de 300 reais (trezentos reais) a ser efetivado pelos autores/responsáveis somente na ocasião do recebimento da carta de aceitação do artigo, quando receberão o respectivo boleto e instruções para o pagamento.

Forma e preparação de manuscritos

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS PRÉVIAS

Revisões e Notas prévias deverão ser organizadas basicamente em: Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, Abstract, Key words, Texto, Agradecimento (se houver) e Referência Bibliográfica.

Atenção especial deve ser dada aos artigos de Revisão evitando a citação Ipsis-litteris de textos, que configura plágio por lei.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os artigos deverão ser organizados em:

TÍTULO: Deverá ser claro e conciso, escrito apenas com a inicial maiúscula, negrito, centralizado, na parte superior da página. Se houver subtítulo, deverá ser em seguida ao título, em minúscula, podendo ser precedido de um número de ordem em algarismo romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico (binômio latino e autor) entre parênteses.

AUTORES: Começar pelo último sobrenome dos autores por extenso (nomes intermediários somente iniciais, sem espaço entre elas) em letras maiúsculas, 2 linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor deverá ser colocado um número sobrescrito que deverá corresponder ao endereço: instituição, endereço da instituição (rua e número ou Caixa Postal, cidade, sigla do estado, CEP, e-mail). Indicar o autor que deverá receber a correspondência. Os autores devem ser separados com ponto e vírgula.

RESUMO: Deverá constar da mesma página onde estão o título e os autores, duas linhas abaixo dos autores. O resumo deverá ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, resumo do material e método, principais resultados e conclusão. Não deverá apresentar citação bibliográfica.

Palavras-chave: Deverão ser colocadas uma linha abaixo do resumo, na margem esquerda, podendo constar até cinco palavras.

ABSTRACT: Apresentar o título e resumo em inglês, no mesmo formato do redigido em português, com exceção do título, apenas com a inicial em maiúscula, que virá após a palavra ABSTRACT.

Key words: Abaixo do Abstract deverão ser colocadas as palavras-chave em inglês, podendo constar até cinco palavras.

INTRODUÇÃO: Na introdução deverá constar breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. As citações de autores no texto deverão ser feitas de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986) ou quando houver mais de dois autores Santos et al. (1996).

MATERIAL E MÉTODO (CASUÍSTICA): Deverá ser feita apresentação completa das técnicas originais empregadas ou com referências de trabalhos anteriores que as descrevam. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Na metodologia deverão constar os seguintes dados da espécie estudada: nome popular; nome científico com autor e indicação da família botânica; nome do botânico responsável pela identificação taxonômica; nome do herbário onde a exsicata está depositada, e o respectivo número (Voucher Number); época e local de coleta, bem como, a parte da planta utilizada.

RESULTADO E DISCUSSÃO: Poderão ser apresentados separados, ou como um só capítulo, contendo a conclusão sumarizada no final.

AGRADECIMENTO: deverá ser colocado neste capítulo (quando houver).

REFERÊNCIA: As referências devem seguir as normas da ABNT 6023 e de acordo com os exemplos:

Periódicos:

AUTOR(ES) separados por ponto e vírgula, sem espaço entre as iniciais. Título do artigo. **Nome da Revista, por extenso**, volume, número, página inicial-página final, ano.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, n.2, p.267-73, 1989.

Livros:

AUTOR. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editora, Ano. Total de páginas. MURRIA, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins**: occurrence, chemistry and biochemistry. 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

Capítulos de livros:

AUTOR(ES) DO CAPÍTULO. Título do Capítulo. In: AUTOR (ES) do LIVRO. **Título do livro**: subtítulo. Edição. Local de Publicação: Editora, ano, página inicial-página final.

HUFFAKER, R.C. Protein metabolism. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology**: a treatise. Orlando: Academic Press, 1983. p.267-33.

Tese ou Dissertação:

AUTOR. **Título em destaque**: subtítulo. Ano. Total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Local.

OLIVEIRA, A.F.M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil**. 1995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Trabalho de Evento:

AUTOR(ES). Título do trabalho. In: Nome do evento em caixa alta, número, ano, local. **Tipo de publicação em destaque...** Local: Editora, ano. página inicial-página final.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: INTERNATIONAL SAVANNA SYMPOSIUM, 3., 1996, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 1996. p.169-71.

Publicação Eletrônica:

AUTOR(ES). Título do artigo. **Título do periódico em destaque**, volume, número, página inicial-página final, ano. Local: editora, ano. Páginas. Disponível em: <<http://www.....>>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano. PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 18 abr. 2005.

Não citar resumos e relatórios de pesquisa, a não ser que a informação seja muito importante e não tenha sido publicada de outra forma. Comunicações pessoais devem ser colocadas no rodapé da página onde aparecem no texto e evitadas se possível. Devem ser também evitadas citações do tipo: Almeida (1994) citado por Souza (1997).

TABELAS: Devem ser inseridas no texto, com letra do tipo Arial 10, espaço simples. A palavra TABELA (Arial 12) deve ser em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico; já quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Tabela).

FIGURAS: As ilustrações (gráficos, fotográficas, desenhos, mapas) devem ser em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, e inseridas no texto. Quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Figura). As legendas e eixos devem ser em Arial 10, enviadas em arquivos separados, com resolução 300 DPI, 800x600, com extensão JPG ou TIFF, para impressão de publicação.

Processo de avaliação: Os manuscritos são analisados por, pelo menos, dois pareceristas, segundo um roteiro de análise baseado principalmente no conteúdo científico. Os pareceristas recomendarão a aceitação com ou sem necessidade de retornar; recusa, ou sugerir reformulações, e que, neste caso, o artigo reformulado retornará ao parecerista até que a avaliação seja concluída. Quando no mínimo 2 pareceristas aprovarem, sem necessidade de retornar, o artigo estará pronto para

ser publicado e o autor receberá a carta de aceite bem como as instruções para pagamento dos custos de tramite (R\$300 reais)*. Os nomes dos pareceristas permanecerão em sigilo, omitindo-se também perante estes os nomes dos autores.

* Somente os artigos aprovados que foram submetidos a partir de 1º de abril de 2013 terão custo para publicação.

Direitos autorais: Ao encaminhar um manuscrito para a RBPM os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias.

ATENÇÃO: Artigos que não estiverem de acordo com essas normas serão devolvidos.

Observação: São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Contudo, reserva-se ao Conselho Editorial, o direito de sugerir ou solicitar modificações que julgarem necessárias.

Envio de manuscritos

Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm.sbpm@gmail.com