

ERICKS SOUSA SOARES

EFEITO DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*, MART.) EM MODELO DE  
EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

BELÉM

2017

ERICKS SOUSA SOARES

EFEITO DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*, MART.) EM MODELO DE  
EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, modalidade Biologia, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.



---

Orientadora: Profª Drª María Elena Crespo López.  
Departamento de Farmacologia – ICB – UFPA

BELÉM

2017

ERICKS SOUSA SOARES

EFEITO DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*, MART.) EM MODELO DE  
EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências  
Biológicas, modalidade Biologia, da Universidade  
Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Bacharel em Biologia.



Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> María Elena Crespo López

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA



Avaliador: Dr<sup>a</sup>. Gabriela de Paula Fonseca Arrifano

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA



Avaliador: Prof. Dr. José Rogério Souza Monteiro

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

BELÉM

2017

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

À minha mãe, Marcicleide, por tudo que fez e ainda faz por mim e pelos meus irmãos, Marcelle e Ronald. Este trabalho não é somente meu, é nosso! Obrigado por existirem na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o auxílio durante estes quatro anos de graduação, por ser tão maravilhoso comigo e nunca desistir de mim.

À minha orientadora, Elena Crespo, por ter me acolhido no laboratório e por ter me ensinado tanta coisa que irei levar comigo por toda a minha vida. Além de técnicas, aprendi a ser um bom pesquisador. Eterna gratidão.

À minha família que, apesar da distância, sempre me apoiou e me ajudou a realizar o sonho de cursar o ensino superior. Vovó Nazaré, irmã Marcelle, irmão Ronald e tantos outros queridos que ocupariam todas as folhas desse documento se eu fosse citar cada um, vocês são meu orgulho e eu não seria nada sem vocês. E claro que eu agradeço àquela que sempre esteve disposta a ouvir como foi meu dia (quase sempre eu reclamando que estava cansado) e sempre tinha as palavras certas para me motivar. Obrigado mãe Marcicleide.

A todos os amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular e a todos que conheci através do mesmo. Ao Rogério e Gabriela, obrigado por todo o conhecimento compartilhado (e não foi pouco!). Ao Ricardo por toda a paciência em sempre me ajudar toda vez que precisei. À Elisabete, Flávia, Luciana e Núbia por todo o apoio. À Camila e Rose por serem tão especiais na minha vida, sempre vou tê-las no meu coração.

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Comportamento pela colaboração neste trabalho, especialmente à professora Cristiane Maia e à Diandra e Bruno que se prontificaram a me ajudar com os animais até tarde da noite.

Ao Laboratório de Neuroquímica Celular e Molecular, por sempre estarem dispostos a me ajudar quando precisei. À Keuri e ao Nil por ficarem até a madrugada na UFPA me ajudado a pesar mercúrio.

Ao Instituto Evandro Chagas, sempre prontos a fornecer os animais sempre que precisávamos, e à Amazon Dreams por ceder o suco de açaí clarificado.

A todos os meus amigos da graduação que sempre estiveram ao meu lado, em especial Caio Gustavo, Carol Maia, Denyse Cardoso, Joás Brito, Klyssia Fonseca e Marcos Damrley. Quando me perguntarem algo marcante sobre o curso, lembrarei de vocês.

A todos que ajudaram na minha permanência em Belém, especialmente à família da Maria das Graças e da Gorete.

À Universidade Federal do Pará, docentes e administração do Instituto de Ciências Biológicas pela oportunidade de conquistar uma carreira acadêmica em uma das

melhores instituições públicas do país e abrir novos horizontes que de outra forma não seria possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	ii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1 ANIMAIS .....	5
2.2 SUCO DE AÇAÍ CLARIFICADO ( <i>EUTERPE OLERACEA</i> , MART.) .....	5
2.3 TRATAMENTOS.....	5
2.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	5
2.4.1 Teste de campo aberto.....	6
2.4.2 Teste de rotarod.....	6
2.4.3 Teste de descida em viga vertical ( <i>pole test</i> ).....	6
2.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	7
2.5.1 Coleta de Amostras .....	7
2.5.2 Peroxidação lipídica .....	7
2.5.3 Conteúdo em Proteína total .....	7
2.5.4 Determinação dos níveis de Nitritos .....	8
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	8
3. RESULTADOS .....	9
3.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	9
3.1.1 Teste de campo aberto.....	9
3.1.2 Teste de Rotarod.....	9
3.1.3 Teste de descida em viga vertical ( <i>pole test</i> ).....	10
3.2 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO TOTAL.....	11
3.2.1 Peroxidação Lipídica.....	11
3.2.2 Nitritos.....	11
4. DISCUSSÃO .....	13
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
6. ANEXOS .....	28



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho experimental adotado para avaliar o efeito do suco clarificado de açaí em modelo de exposição ao MeHg.....8
- Figura 2:** Efeito do suco clarificado de açaí (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg) na atividade locomotora e exploratória de camundongos no teste de campo aberto: distância total percorrida em metros (A) e número de levantamentos exploratórios (*rearing*) (B). Resultados expressados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (teste ANOVA).....9
- Figura 3:** Efeito do suco clarificado de açaí (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg) na função motora de camundongos no teste de Rotarod: latência (segundos) para a primeira queda (A) e número de quedas no treino e nas três exposições (B). Resultados expressados como medianas  $\pm$  intervalos interquartis (n=6). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis).....10
- Figura 4:** Efeito do suco clarificado de açaí (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg) no controle do movimento e força dos membros em teste de descida vertical (*pole test*): tempo de virada em segundos, dos grupos experimentais (A) e tempo de descida, em segundos, dos grupos experimentais (B). Resultados expressados como medianas  $\pm$  intervalos interquartis (n=6). \*P<0,05 vs todos os grupos (Teste de Kruskal-Wallis).....10
- Figura 5:** Peroxidação lipídica ( $\eta$ mol de MDA por mg de proteína) em cérebro de camundongos tratados com açaí (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg). Resultados expressados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6).\*P<0,05 vs todos os grupos (Teste ANOVA).....11
- Figura 6:** Níveis de nitrito em cérebro de camundongos tratados com açaí (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg). Resultados expressados como média  $\pm$  erro padrão da média.(n=6). \*P<0,05 vs todos os grupos (Teste ANOVA).....12

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ISSN – International Standard Serial Number

MeHg – Metilmercúrio

MM - Methylmercury

µl/g – microlitro por grama

OMS – Organização Mundial da Saúde

MART – Martius

g – grama

IEC – Instituto Evandro Chagas

°C – grau Celsius

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

UFPA – Universidade Federal do Pará

% – por cento

EO – *Euterpe oleracea*

n – número amostral

mg/kg – miligrama por quilograma

NEDA - N-(1-naftil)-etilenodiamina

PBS – Tampão fosfato-salino

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

cm – centímetro

™ – Trade Mark

r – raio

rpm – rotação por minuto

® – registrado

pH – potencial hidrogeniônico

nm – nanometro

BSA – albumina sérica bovina

mg/ml – miligrama por mililitro

μl – microlitro

MDA – malonaldeído

NMFI – N-metil-2-fenilindol

mM – milimolar

± – mais ou menos

ANOVA – análise de variância

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

HCl – ácido clorídrico

μmol/ml – micromol por mililitro

SNC – Sistema Nervoso Central

nNOS – Óxido nítrico-sintase neuronal

NMDA – N-metil D-Aspartato

## RESUMO

A contaminação por metilmercúrio (MeHg) é um sério problema de saúde pública no estado do Pará e um motivo de preocupação nacional, já que o mesmo é uma das substâncias mais tóxicas encontradas na natureza. Vários estudos demonstram que os níveis de MeHg encontrados em populações ribeirinhas da Amazônia ultrapassam os limites preconizados pela Organização Mundial da Saúde, o que é algo alarmante já que o MeHg pode interferir em funções estruturais tanto celulares quanto sub-celulares gerando radicais livres e causando graves danos, especialmente ao cérebro, o principal órgão alvo. Desta forma, substâncias com efeitos antioxidantes, como é o caso do açaí (*Euterpe oleracea*), poderiam minimizar os efeitos do estresse oxidativo. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a possível atividade neuroprotetora do açaí em modelo de exposição aguda ao metilmercúrio, analisando tantos indicadores de estresse oxidativo quanto aspectos comportamentais. Foi possível observar prejuízos causados pelo MeHg e que, na dose de 10 µl/g utilizada, o açaí possuiu efeito antioxidante potente, oferecendo proteção contra danos oxidativo. Desta forma, este trabalho demonstra pela primeira vez que o açaí, utilizado na dose de 10 µl/g em modelo de exposição aguda, possui efeito neuroprotetor potente, diminuindo os danos causados pelo MeHg. Logo, o consumo regular do suco auxilia na proteção de danos causados pela substância.

**Palavras-chave:** *Euterpe oleracea*, Açaí, Metilmercúrio, Estresse oxidativo, Antioxidante, Exposição.

## ABSTRACT

Contamination by methylmercury (MM) is a serious public health problem in the state of Pará and it is a cause of national concern, since it is one of the most toxic substances found in nature. Several studies have demonstrated that the levels of MM found in Amazonian riverside populations exceed the limits recommended by the World Health Organization. That is alarming because MM can interfere in both cellular and subcellular structural functions, generating free radicals and to cause grave damage, especially in the brain, the main target organ. Thus, substances with antioxidant effects, such as açai (*Euterpe oleracea*), could decrease the effects of oxidative stress. The aim of this study was to investigate a possible neuroprotective activity of açai in an acute methylmercury exposure model, analyzing indicators of oxidative stress as well as behavioral aspects. It was possible to observe damage caused by MM and that at the dose of 10 µl/g used, the açai had a potent antioxidant effect, offering protection against oxidative damages. This work demonstrates for the first time that açai, used in a model of acute exposure, has potent neuroprotective effect, decreasing the damages caused by MeHg. Therefore, the regular consumption of açai juice helps to protect against damage caused by the substance.

**Keywords:** *Euterpe oleracea*, Acai, Methylmercury, Oxidative stress, Antioxidant, Exposure.

**APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
ARTIGO**

**EFEITO DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*, MART.) EM MODELO DE  
EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO**

**Autores:** Ericks Sousa Soares, Rose Inês Matos Batista, Ricardo Sousa de Oliveira Paraense, Camila Lorena Rodrigues Machado, José Rogério Souza Monteiro, Gabriela de Paula Fonseca Arrifano, Diandra Araújo da Luz, Bruno Gonçalves Pinheiro, Cristiane do Socorro Ferraz Maia, María Elena Crespo López.

**Revista:** Fitoterapia

**ISSN:** 0367-326X

## **Efeito do açaí (*Euterpe oleracea*, MART.) em modelo de exposição ao metilmercúrio**

Ericks Sousa Soares<sup>a</sup>, Rose Inês Matos Batista<sup>a</sup>, Ricardo Sousa de Oliveira Paraense<sup>a</sup>, Camila Lorena Rodrigues Machado<sup>a</sup>, José Rogério Souza Monteiro<sup>a</sup>, Gabriela de Paula Fonseca Arrifano<sup>a</sup>, Diandra Araújo da Luz<sup>b</sup>, Bruno Gonçalves Pinheiro<sup>b</sup>, Cristiane do Socorro Ferraz Maia<sup>b</sup>, María Elena Crespo López<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém-Pará

<sup>b</sup> Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Comportamento, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-Pará

\***Autor Correspondente:** María Elena Crespo López. Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, nº 1, CEP 66075-110, Guamá, Belém, Pará. Fone: +55 91 3201-8212. E-mail: [ecrespo@ufpa.br](mailto:ecrespo@ufpa.br)

### **1. INTRODUÇÃO**

A contaminação por metilmercúrio é um sério problema de saúde pública no Estado do Pará. Essa contaminação é de origem tanto antropogênica (atividade garimpeira) como não antropogênica (por exemplo, o solo da região é rico em mercúrio) [1]. Os riscos para a saúde das populações expostas e os vários problemas ambientais relacionados têm sido vistos como um desastre iminente [2]. O mercúrio é uma das substâncias mais tóxicas encontradas na natureza e a sua forma metilada, o metilmercúrio (MeHg), é altamente neurotóxica tanto para humanos como para outros seres vivos [3,4]. O MeHg é formado especialmente em ambientes aquáticos onde íons de mercúrio sofrem ação de bactérias anaeróbicas, transformando-se em metilmercúrio [5].

Estima-se que as emissões globais de mercúrio estejam na faixa de 5,000 a 8,000 toneladas por ano [6]. No Brasil, o seu principal fim é a amalgamação do ouro [7,2]. O decreto 97.507/89 proíbe a utilização de mercúrio para extrair ouro, a não ser que as atividades sejam licenciadas por órgãos ambientais. Já o decreto 97.632/89 regulamenta a

obrigatoriedade da recuperação de áreas degradadas pela atividade garimpeira. Porém sabe-se que pouco ou mesmo nada disso é seguido e os maiores prejudicados são os moradores de áreas próximas.

Estudos já realizados demonstram que os níveis de MeHg encontrados em populações ribeirinhas da Amazônia ultrapassam os limites preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [8,9,10]. Tais dados são alarmantes, já que no corpo humano a grande afinidade do metilmercúrio por grupamentos sulfidrilas e em menor grau por grupos fosforilas, carboxílicos, amidas e aminas, pode interferir nas funções estruturais tanto celulares quanto sub-celulares. Uma das consequências deletérias é a produção excessiva de radicais livres, gerados pelo processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, que supre a necessidade energética cerebral [11]. Esta produção excessiva ocasiona estresse oxidativo, onde espécies reativas atacam biomoléculas, comprometem a liberação de neurotransmissores e causam graves danos ao cérebro e ao sistema nervoso periférico [12,13,14]. Assim, percebe-se a importância da utilização de biomarcadores sensíveis o bastante para detectar e mensurar o estresse oxidativo no tecido cerebral.

Na exposição, o MeHg reage com outros grupos do organismo e ocasiona dano oxidativo [15]. Além disso, acredita-se que o aumento de radicais livres também tenha relação com a neurotoxicidade do mesmo [16,17]. E dentre os radicais gerados destaca-se o óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso e um dos principais responsáveis pelo estresse oxidativo na célula [11]. Ele é sintetizado a partir de arginina pela óxido nítrico-sintase, uma enzima citosólica que pode ser encontrada em grande quantidade no cérebro [12]. As moléculas de NO produzidas reagem rapidamente com as biomoléculas próximas e acabam se transformando em moléculas de nitratos e nitritos, que são subprodutos dessa reação mais estáveis que o NO. A concentração de nitritos, portanto, indica de forma indireta a produção de NO; assim, a dosagem de nitritos é um dos métodos mais utilizados para detecção de NO em amostras biológicas [18].

Uma das consequências mais graves do estresse oxidativo celular é a peroxidação lipídica [19]. A peroxidação de lipídeos ocorre através da interação de ácidos graxos poli-insaturados com espécies reativas, gerando peróxidos que produzem hidroperóxidos. Estes últimos produzem mais peróxidos ainda, o que pode afetar os lipídeos das membranas celulares. Ao ocorrer esta lesão nas membranas, as consequências são a destruição de sua estrutura, a perda das trocas metabólicas e em último caso, a morte celular [20]. Um dos produtos da peroxidação lipídica é o malonaldeído (MDA), utilizado para medir a intensidade da peroxidação lipídica [21].



Estudos demonstram que a intoxicação diminui a função motora [22,23], induzindo estresse oxidativo e apoptose nas células granulares do cerebelo [24,25]. O córtex cerebral e o cerebelo, em especial, são muito afetados e sofrem neurodegeneração. Como estão envolvidos na atividade locomotora, os déficits motores tornam-se evidentes [26,27,28,22]. Como um desses déficits, pode-se citar a bradicinesia onde há uma limitação nos movimentos [29].

Algumas substâncias naturais demonstram diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo. A Amazônia, por exemplo, é um dos maiores reservatórios naturais do mundo, com alta biodiversidade e riqueza de produtos naturais utilizados no dia a dia das populações, destacando-se aquelas com atividade antioxidante já comprovada, uma vez que existe uma relação entre estresse oxidativo e intoxicação mercurial [15]. Desta forma, substâncias com efeitos antioxidantes poderiam minimizar os efeitos do estresse oxidativo, através de vários mecanismos de ação, tais como captura de radicais livres por doação de hidrogênio (antioxidantes primários) ou decomposição de peróxidos, inibição de enzimas oxidativas e quelação de metais (antioxidantes secundários) [30]. Alguns estudos demonstram que antioxidantes possuem um papel protetor frente aos efeitos do MeHg. Por exemplo, Manzolli *et al.*, (2015) [31], utilizando o flavonóide crisina encontrado principalmente no maracujá (*Passiflora* sp.) e De Paula *et al.*, (2016) [32], utilizando niacina (também conhecida como vitamina B<sub>3</sub>) observaram redução nos danos causados pela exposição no fígado e nos rins e cérebro, respectivamente. Assim, os frutos são fontes naturais ricas em flavonoides e substâncias antioxidantes que seriam de fácil acesso para a população exposta.

Um dos frutos mais consumidos na Amazônia, especialmente na forma de suco, e que apresenta uma grande capacidade antioxidante é o açaí [33,34]. Ele provém da *Euterpe oleracea*, MART., uma monocotiledônea da família Arecaceae. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes e a diminuição da peroxidação lipídica são características da alta capacidade antioxidante do fruto [35].

Recentemente, Brasil *et al.*, (2016) [36] comprovou que uma dieta enriquecida com o fruto é capaz de prevenir as alterações causadas pelo MeHg na resposta electroretinográfica a estímulos e na peroxidação lipídica da retina de ratos anestesiados. Entretanto, a sintomatologia usualmente associada à intoxicação humana por MeHg é originada pelas alterações em outras partes do SNC, especialmente aquelas relacionadas com o controle motor. Assim, torna-se necessário saber se o açaí seria capaz de proteger todo o cérebro, e não só a retina, transformando-se em uma alternativa real para ajudar a prevenir os efeitos do mercúrio em sua forma metilada.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível papel protetor do açaí no controle motor e estresse oxidativo cerebral de animais expostos agudamente à intoxicação mercurial

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Camundongos Swiss machos, de 6 a 8 semanas, pesando entre 20 e 30 g, foram mantidos em condições padronizadas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas e com água e comida *ad libitum*. Os animais foram manipulados de maneira apropriada para evitar o estresse desnecessário. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação – CEPAE (BIO 91/15 – UFPA).

### 2.2 SUCO DE AÇAÍ CLARIFICADO (*EUTERPE OLERACEA*, MART.)

Através de um processo patenteado (PI 1003060-3), o suco de açaí clarificado foi produzido e cedido pela Amazon Dreams (Belém, Pará, Brasil). O suco passa por um processo de microfiltração e centrifugação que elimina as fibras, lipídeos e proteínas.

### 2.3 TRATAMENTOS

Vinte e quatro animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos, com seis animais cada um. Todos receberam suco de açaí clarificado (10 µl por grama de peso corporal) [37] ou salina (10 µl/g) por gavagem durante 8 dias, às 9:00 horas. A partir do quarto dia de tratamento, todos os animais receberam também uma injeção intraperitoneal diária de tampão fosfato-salino (PBS) ou de uma solução de 2,5 mg/kg de MeHg [38] diluída em PBS, compondo os grupos Controle (animais tratados com salina e PBS), EO (animais tratados com suco de açaí e PBS), MeHg (animais tratados com salina e MeHg) e EO+MeHg (animais tratados com suco de açaí e MeHg).

### 2.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Após aclimatação, um dia após a última dose dos tratamentos, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais: teste de campo aberto, teste de descida em viga vertical (*pole test*) e teste de Rotarod.

### **2.4.1 Teste de campo aberto**

Para analisar os parâmetros de ansiedade e atividades locomotora e exploratória [39] utilizou-se o teste de campo aberto [40]. O aparato consiste em uma arena quadrada de madeira, com piso dividido em 25 quadrantes iguais. Os animais eram colocados no centro do campo por 5 minutos, analisando-se o número de levantamentos exploratórios (*rearing*) e a distância total percorrida (medida através do sistema de monitoramento de vídeo ANY-maze<sup>TM</sup> versão 4.99).

### **2.4.2 Teste de rotarod**

Para avaliar déficits neurológicos, utilizou-se o teste de Rotarod [41]. O aparelho (Insight<sup>®</sup>, EFF-411) consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro mantido em rotação através de um motor. Os animais eram colocados sobre este cilindro em rotação, sendo cronometrado o tempo para a primeira queda (latência) e o número total de quedas. Primeiramente era feito um teste de 120 segundos a dez rotações por minuto (rpm) e após 300 segundos de descanso, os animais passavam por três exposições de 10, 16 e 20 rpm [42], de 120 segundos cada e com 300 segundos de descanso entre as exposições.

### **2.4.3 Teste de descida em viga vertical (*pole test*)**

O teste de descida em viga vertical avalia distúrbios de movimento [43], consistindo em uma viga vertical áspera (2 x 50 cm) apoiada em uma plataforma circular (1 cm; r = 25 cm). O objetivo do teste é que, uma vez no topo da viga com a cabeça voltada para cima, os animais sejam capazes de virar e descer até a base da plataforma. Primeiro passavam por um período de aclimação de 300 segundos e em seguida por cinco exposições de 120 segundos, com 60 segundos de descanso entre cada uma. Foram anotados o tempo de virada e de descida da viga e caso não conseguissem virar ou caíssem, recebiam o tempo máximo. A média foi calculada com base nos três melhores tempos de cada animal para os dois parâmetros analisados.

## 2.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 2.5.1 Coleta de Amostras

Após 24 horas do fim da avaliação comportamental, os animais foram anestesiados (Xilasina: 100mg/kg; Quetamina: 10mg/kg) e posteriormente sacrificados para coleta do cérebro total, que foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -20° C.

### 2.5.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica das amostras foi determinada de acordo com Esterbauer & Cheeseman (1990) [44] através da quantificação do cromóforo produzido pela reação do MDA com N-metil-2-fenilindol (NMFI) em presença de ácido metanosulfônico. A quantidade de cromóforo produzido foi mensurada por espectrofotometria, sendo proporcional à concentração de lipídeos oxidados. Trezentos e vinte cinco microlitros de NMFI a 10,3mM, diluído em 650 µL de metanol, e 75 µL de ácido metanosulfônico foram adicionados a 100 µL de soluções padrões de MDA ou das amostras, incubadas por 40 minutos a 45° C. A leitura foi feita no comprimento de onda de 570 nm e os resultados expressos como picomoles de MDA por miligrama de proteína.

### 2.5.3 Conteúdo em Proteína total

Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 5600 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi separado em alíquotas para determinação dos níveis de peroxidação lipídica e quantificação de proteína total. Para determinação do teor de proteína total utilizou-se o método de Bradford [45], baseado na interação entre o reagente de Bradford (corante Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol e ácido fosfórico) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Brevemente, as amostras foram incubadas com o reagente de Bradford por 05 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi medida a absorbância a 590nm. Os resultados das amostras foram comparados com aqueles de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

### 2.5.4 Determinação dos níveis de Nitritos

Para determinação dos níveis de nitritos seguiu-se o método de Green *et al.* (1982) [46], onde os nitritos reagem com a sulfanilamida em meio ácido formando diazo que reage com o cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEDA), formando um composto de coloração intensa. As amostras foram descongeladas e homogeneizadas com Tris (tris(hidroximetil)aminometano)-HCl em uma proporção 1:10 (grama de tecido: mililitros). Logo após centrifugação (14000 rpm por 10 minutos) em centrífuga refrigerada, o sobrenadante foi incubado com sulfanilamida e NEDA (1:1) à temperatura ambiente por 20 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm e comparada com medições de concentrações padrão de nitrito de sódio. Os dados foram expressados em  $\mu\text{mol}$  de nitritos por mg de proteínas.



**Figura 1:** Desenho experimental adotado para avaliar o efeito do suco clarificado de açaí em modelo de exposição ao MeHg.

### 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

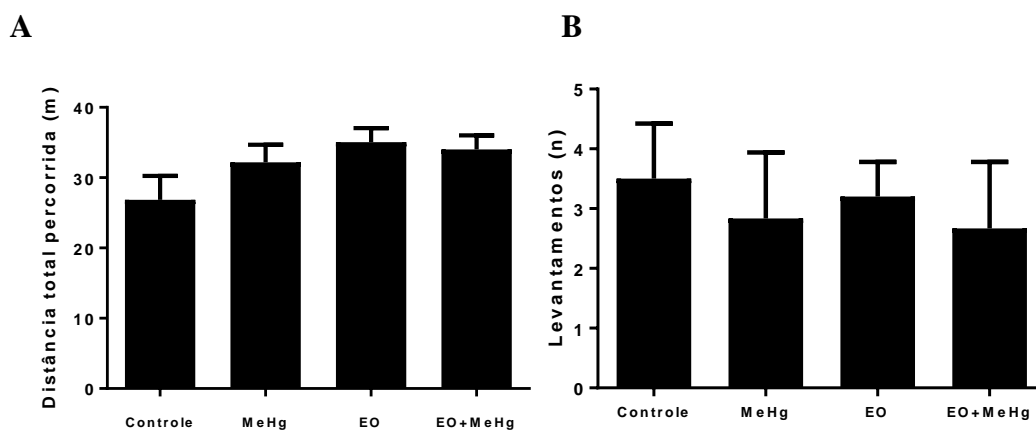
A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 6.01. A distribuição gaussiana dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando paramétrica, os dados experimentais foram expressados como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados com o teste de ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* Tukey. Quando a distribuição foi não-paramétrica, os dados foram representados como mediana  $\pm$  intervalos interquartis e analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* Dunn. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo para todas as análises.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

##### 3.1.1 Teste de campo aberto

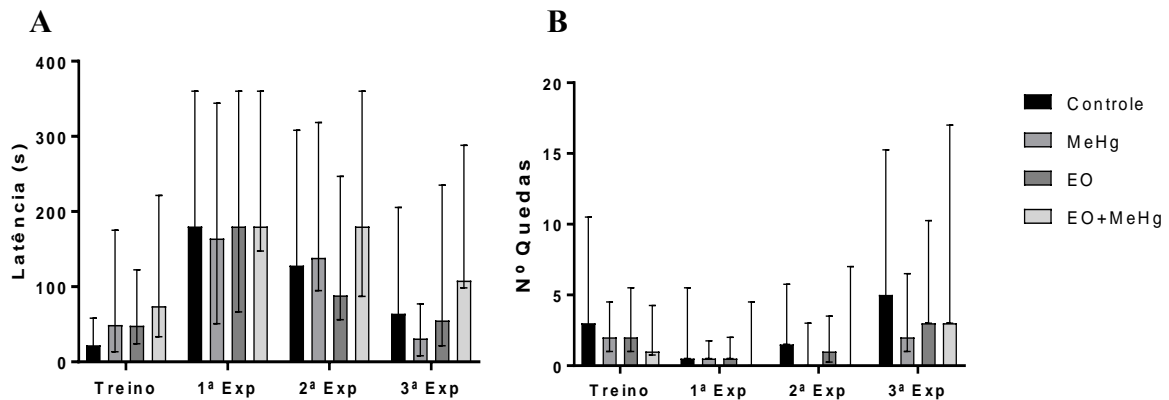
O teste de campo aberto mostrou que o tratamento com açai e MeHg (Figura 2 A e B), não afetou a atividade locomotora dos animais ao se analisar os parâmetros de distância total percorrida e levantamentos exploratórios, quando comparados entre si e com o grupo controle.



**Figura 2:** Efeito do suco clarificado de açai (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg) na atividade locomotora e exploratória de camundongos no teste de campo aberto: distância total percorrida em metros (A) e número de levantamentos exploratórios (*rearing*) (B). Resultados expressados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (teste ANOVA).

##### 3.1.2 Teste de Rotarod

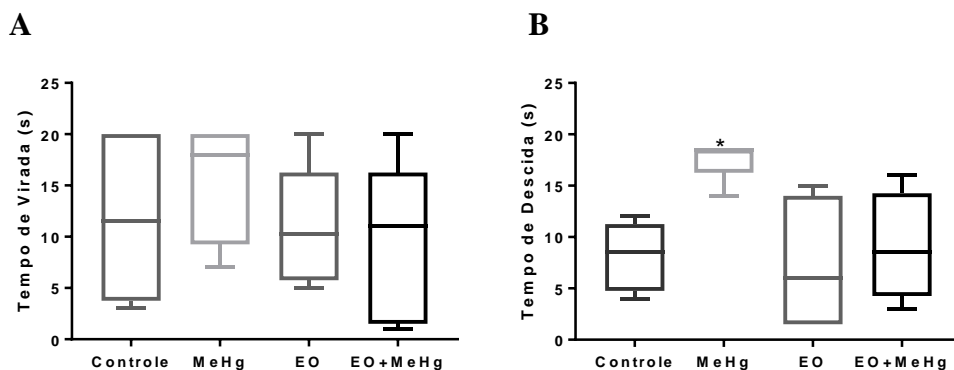
No teste de Rotarod, a latência para a primeira queda (Figura 3 A) e o número total de quedas para cada animal (Figura 3 B) não apresentaram diferenças estatísticas significativas.



**Figura 3:** Efeito do suco clarificado de açai (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg) na função motora de camundongos no teste de Rotarod: latência (segundos) para a primeira queda (A) e número de quedas no treino e nas três exposições (B). Resultados expressados como medianas  $\pm$  intervalos interquartis (n=6). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis).

### 3.1.3 Teste de descida em viga vertical (*pole test*)

Na exposição aguda ao MeHg não houve diferença estatística para o tempo de virada (Figura 4 A), porém houve diferença no tempo de descida da viga (Figura 4 B) ( $p=0,0002$ ), evidenciando que o tratamento agudo com MeHg aumentou o tempo necessário para os animais conseguirem descer da viga de madeira. Animais tratados com MeHg e que também receberam açai foram capazes de descer da viga de madeira em um tempo semelhante aos dos grupos Controle e EO, demonstrando que o fruto protegeu os animais contra danos motores causados pelo MeHg.



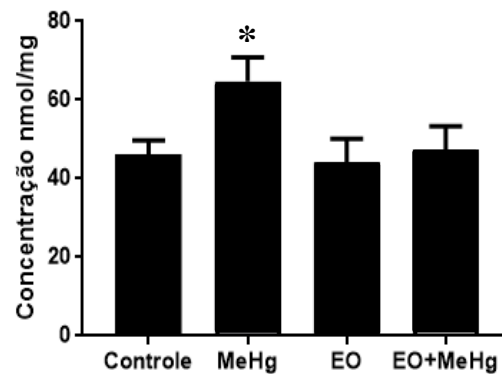
**Figura 4:** Efeito do suco clarificado de açai (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg) no controle do movimento e força dos membros em teste de descida vertical (*pole test*): tempo de virada em segundos, dos grupos experimentais (A) e tempo de descida, em segundos, dos grupos experimentais (B). Resultados expressados como medianas  $\pm$  intervalos interquartis (n=6). \* $P < 0,05$  vs todos os grupos (Teste de Kruskal-Wallis).



## 3.2 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO TOTAL

### 3.2.1 Peroxidação Lipídica

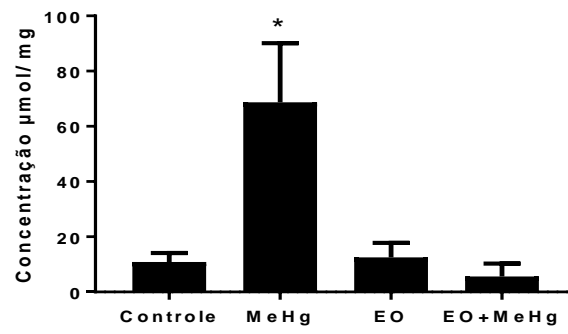
A peroxidação lipídica dos animais tratados com MeHg foi estatisticamente significativa, com  $p < 0.05$ . Enquanto isso, os níveis de peroxidação lipídica do grupo EO+MeHg se manteve semelhante aos níveis dos grupos Controle e EO, ou seja, o açaí preveniu a peroxidação dos lipídeos de membrana, ocasionada devido à neurotoxicidade do MeHg.



**Figura 5:** Peroxidação lipídica (nmol de MDA por mg de proteína) em cérebro de camundongos tratados com açaí (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg). Resultados expressados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). \* $P < 0,05$  vs todos os grupos (Teste ANOVA).

### 3.2.2 Nitritos

Os níveis de nitrito nos grupos tratados com metilmercúrio foram muito maiores que aquelas dos outros grupos, com diferença estatística significativa entre os grupos. Apesar disso, o grupo tratado tanto com MeHg como com açaí não apresentou níveis elevados, mantendo-se próximos dos grupos que não foram expostos. Logo, o suco clarificado de açaí, através de um potente efeito protetor, preveniu completamente a formação do radicais livres, neste caso o NO.



**Figura 6:** Níveis de nitrito em cérebro de camundongos tratados com açai (EO) e/ou metilmercúrio (MeHg). Resultados expressados como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=6). \* $P < 0,05$  vs todos os grupos (Teste ANOVA).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o suco de açaí, *E. oleracea*, clarificado, utilizado na dose de 10 µl/g em modelo de exposição aguda, possui efeito neuroprotetor potente, diminuindo os danos causados pelo MeHg.

Recentemente, Brasil *et al.*, (2016) [36] submeteu ratos a uma dieta enriquecida com a polpa de açaí (misturada à ração) assim como à administração de MeHg (5 mg/Kg diariamente por 7 dias) por gavagem, demonstrando que a resposta eletrofisiológica da retina não era alterada e que diminuía a peroxidação lipídica do tecido retiniano. Entretanto, o metilmercúrio não afeta unicamente à retina, sendo sua neurotoxicidade mais generalizada e afetando principalmente a regiões de controle motor que fazem que a principal sintomatologia da intoxicação por MeHg seja relacionada a distúrbios motores.

O modelo de exposição mercurial aguda utilizado foi ligeiramente modificado daquele descrito por Yee *et al.*, (1994) [38]. Os autores injetaram via intraperitoneal 2,5 mg/kg de MeHg em camundongos diariamente durante 03, 07 e 14 dias e observaram aumento significativo da geração de radicais livres a partir do terceiro dia. Para garantir a ocorrência de estresse oxidativo no cérebro dos animais, mas assegurando ao mesmo tempo a sobrevivência de todos eles, decidimos realizar uma exposição de 4 dias.

A administração de MeHg pela via intraperitoneal garante a dose de metal que chega no cérebro porque a cavidade peritoneal possui uma rápida absorção, fazendo com que a substância chegue mais rápido na circulação, sem que tenha que passar primeiro pelo fígado, onde parte pode ser metabolizado antes de atingir a circulação. Ainda, o fato de escolher diferentes vias de administração para o MeHg e o suco de açaí (diferente do desenho experimental escolhido por Brasil *et al.*, (2016) [36]), também garante que não existirá nenhuma interferência dos componentes do suco na absorção do MeHg, eliminando a possibilidade de sequestro por grupos tióis. Em definitiva, esse tempo e via de exposição provocou estresse oxidativo e bradicinesia (Figuras 5 e 4 B).

Ainda, o suco de açaí clarificado foi administrado por gavagem devido Souza-Monteiro *et al.*, (2015) [37] ter demonstrado previamente que a administração por esta via é capaz de reduzir o estresse oxidativo (neste caso provocado por convulsões). Além disso, estaríamos simulando o que ocorre na ingestão do suco de açaí pelas populações – a via oral. O suco clarificado foi escolhido exatamente por passar por um processo de microfiltração e centrifugação que elimina fibras, lipídeos e proteínas que, de outra forma, poderiam interferir nas análises. A dose de suco de açaí de 10 µL utilizada por Souza-Monteiro *et al.*, (2015) [37] também foi a mesma aqui utilizada e tal dose equivale a cerca de 700 ml de açaí para uma

pessoa de 70 kg, o que representa o consumo diário de muitas famílias da região norte do país [47].

A atividade locomotora de animais tem sido largamente utilizada para detectar déficits motores causados pela toxicidade do MeHg [48,49]. Em nosso estudo, a distância total percorrida em metros na arena do campo aberto (Figura 2 A) foi semelhante entre todos os grupos, assim como número de levantamentos exploratórios (*rearings*) (Figura 2 B), sem diferenças estatísticas. Nossos resultados corroboram outros estudos, como por exemplo Bourdineaud *et al.* (2012) [50], que utilizou um modelo de exposição de 1,5 mg/kg por 29 dias, e Doré *et al.* (2001) [51], com um modelo de 4 ou 6 mg/kg por 14 dias, ambos com camundongos, que também observaram não haver diferenças entre os grupos experimentais neste mesmo teste. Porém, a atividade no teste de campo aberto é avaliada de forma geral, sendo por vezes não tão precisa [52]. Dessa forma, este teste não seria o mais adequado para a detecção das alterações comportamentais provocadas pelo MeHg.

No teste de Rotarod são medidos déficits neurológicos relacionados a distúrbios de movimento e coordenação. No presente estudo, tanto a latência quanto o número de quedas não foram significativos (Figura 3 A e B), sem aparente prejuízo motor para os animais expostos. De igual forma, Bellum *et al.* (2012) [53], utilizando MeHg na dose de 5 mg/kg por 5 dias, também observou não haver diferenças significativas entre os grupos. Portanto, o MeHg poderia estar afetando outros aspectos comportamentais diferentes daqueles medidos pelo teste de Rotarod.

Os dois testes anteriormente discutidos avaliam parâmetros mais gerais dos efeitos da intoxicação, como locomoção e coordenação, portanto, testes comportamentais que conseguem avaliar aspectos mais característicos da sintomatologia do MeHg seriam mais precisos na avaliação de prejuízos comportamentais causados pelo mesmo, como é o caso do teste de descida em viga vertical, o *Pole Test*, que avalia especialmente a bradicinesia.

Embora não tenha havido diferenças no tempo de virada na viga (Figura 4 A), os animais tratados unicamente com MeHg levaram um maior tempo para descer da viga de madeira (Figura 4 B). Isto mostra que mesmo concentrações de MeHg, como a usada no presente trabalho (2,5 mg/kg por 4 dias), são capazes de provocar neurotoxicidade o suficiente para comprometer a função motora de camundongos causando um comportamento do tipo bradicinesia. Este distúrbio é caracterizado por uma lentidão nos movimentos, sendo encontrada em doenças neurodegenerativas do SNC como o Mal de Parkinson. Isto acontece devido a um funcionamento anormal dos circuitos neurais por meio da hipoatividade seletiva de duas áreas: a motora suplementar e o córtex pré-frontal dorsal [29,54]. Assim, nossos

resultados parecem indicar que o *Pole Test* seria o melhor teste, dentre os três aqui testados, para avaliar o prejuízo motor causado pelo MeHg.

Ainda, como esperado, os animais tratados com MeHg e que também receberam açaí possuíram um ótimo desempenho no tempo de descida da viga de madeira, ao contrário dos animais que receberam apenas MeHg (Figura 4 B). Logo, o açaí foi capaz de prevenir o comportamento do tipo bradicinesia causado pela intoxicação.

Entretanto, qual seria o mecanismo molecular pelo qual o açaí é capaz de exercer essa proteção? Uma das hipóteses é aquela relacionada à elevada capacidade antioxidante do suco, que chega a ser até 10 vezes mais potente que aquela de uma solução de 1 mg/ml de ácido ascórbico [37]. Considerando que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos moleculares de ação do MeHg e que o cérebro é especialmente sensível às variações na capacidade antioxidante do ambiente celular, parece lógico pensar que o açaí poderia exercer seu efeito protetor prevenindo esse estresse.

Por meio de uma reação em cadeia, os lipídeos das membranas celulares são lesados, o que leva à destruição da membrana e morte celular [12]. A peroxidação lipídica é apontada como uma das características moleculares na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (15). Por exemplo, Li *et al.*, (2014) [55], utilizando um modelo de exposição através da água fornecida a camundongos mostrou que o MeHg aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio e diminui a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase, o que leva ao processo de peroxidação lipídica. Confirmando a hipótese de que a peroxidação lipídica é um processo associado à neurotoxicidade do MeHg, nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de MDA nos animais tratados com MeHg e que apresentaram comportamento do tipo bradicinesia (Figuras 5 e 4 B).

Como já demonstrado previamente por Souza-Monteiro *et al.*, (2015) [37], o suco de açaí clarificado é capaz de diminuir significativamente os níveis de peroxidação lipídica provocados em situações tão extremas como são as crises convulsivas e, desta forma, tornar-se uma alternativa terapêutica viável no tratamento de convulsões, que têm em comum com a intoxicação mercurial o processo de peroxidação lipídica.

No nosso estudo, o nível de peroxidação lipídica dos animais do grupo EO+MeHg se mantiveram semelhantes aos grupos que não foram expostos ao MeHg (Figura 5). Portanto, a dose de *E. oleracea* aqui utilizada (10 µl/g) por quatro dias mostrou possuir um efeito neuroprotetor potente, prevenindo os efeitos deletérios do mercúrio em sua forma metilada.

Um dos principais responsáveis do estresse oxidativo associado à neurotoxicidade provocada pelo MeHg é o radical livre óxido nítrico (15). O óxido nítrico é um mediador de

funções fisiológicas e regulador de processos patológicos [56], mas também pode gerar lesão celular [57] devido à produção de dióxido de nitrogênio. Os mecanismos envolvendo MeHg e NO não são totalmente claros, porém sabe-se que o evento central da neurotoxicidade é um desequilíbrio no glutamato extracelular [15]. Durante a exposição, os níveis de glutamato aumentam, causando um *up regulation* nos receptores do tipo NMDA e aumentando o influxo de cálcio para os neurônios pós-sinápticos. O aumento na formação do NO ocorre devido à atividade da óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS), ativada pelos altos níveis de cálcio intracelular [15].

Assim como em estudos prévios [58,59], em nosso estudo foi possível observar um aumento nos níveis de nitritos em camundongos tratados com MeHg (Figura 6). Em contrapartida, camundongos tratados com MeHg e que também receberam açaí apresentaram níveis muito baixos sem diferença significativa com o controle, evidenciando que o tratamento com o suco foi capaz de prevenir a produção de radicais livres como o óxido nítrico. Essa capacidade antioxidante e de eliminação de radicais livres é usualmente atribuída às altas concentrações de antocianinas e compostos fenólicos que contém o fruto [60]. Recentemente, foi demonstrada a proteção fornecida *in vitro* pelo composto fenólico hidroxitirosol frente à neurotoxicidade induzida pelo MeHg [61]. Embora o hidroxitirosol não seja um composto maioritário no açaí, outros compostos fenólicos poderiam estar exercendo efeitos protetores semelhantes. Estudos adicionais poderão confirmar os compostos que são os principais responsáveis pelos efeitos observados *in vivo* no presente trabalho.

Infelizmente a exposição humana ao MeHg é uma triste realidade no mundo, o que é muito grave já que o mesmo pode ocasionar tremores, ataxia, dificuldade auditiva, perda da voz, diminuição da sensibilidade e do campo visual, coma e morte [62]. Na década de 50, por exemplo, os moradores da cidade de Minamata, localizada no Japão, foram vítimas de um grande desastre ambiental por causa do descarte de mercúrio nas águas da baía da cidade [63]. Como eles se alimentavam dos frutos do mar da baía e utilizavam a água para suas atividades diárias, acabaram por se intoxicar com grandes quantidades do metal e milhares de pessoas morreram [62]. De forma semelhante, populações ribeirinhas da região Amazônica do Brasil consomem peixe vindo de rios afetados pelo descarte irregular de mercúrio [64], portanto, propostas terapêuticas que prevenissem contra a neurotoxicidade do MeHg poderiam auxiliá-los.

Cabe destacar que a proposta de uma alternativa terapêutica de fácil acesso, como é o açaí, adquire especial relevância para populações isoladas como são as populações ribeirinhas da Amazônia, onde a precariedade da atenção à saúde e o limitado poder aquisitivo

para a obtenção de remédios, são sérios agravantes do problema de tratar adequadamente a intoxicação mercurial humana.

### **CONFLITOS DE INTERESSE**

O autor declara que não há conflitos de interesse.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Instituto Evandro Chagas (Pará, Brasil), por gentilmente fornecer os animais para este estudo, a Amazon Dreams (Pará, Brasil), por conceder as amostras de suco de açaí clarificado. O apoio financeiro foi fornecido pelo Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPA (PROPESP, UFPA, Brasil). E. S. SOARES agradece ao CNPq pela bolsa PIBIC.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. C. Wasserman, S. S. Hacon, M. A. Wasserman, O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo & Vida*. 2 (2001) 46-53.
- [2] J. G. Dórea, R. J. Marques, Mercury levels and human health in the Amazon Basin. *Annals of Human Biology*. (2016) (DOI: 10.1080/03014460.2016.1192682).
- [3] T. W. Clarkson, The three modern faces of Mercury. *Environmental Health Perspectives*. 110 (2002) 11-23.
- [4] M. Farina, J. B. T. Rocha, M. Aschner, Oxidative stress and methylmercury-induced neurotoxicity, Indianapolis: John Wiley & Sons. (2010) (DOI: 10.1002/9780470917060.ch18).
- [5] H. Hsu-Kim, K. H. Kucharzyk, T. Zhang, M. A. Deshusses, Mechanisms regulating Mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: a critical review. *Environmental Science & Technology*. 47 (2013) 2441-2456.
- [6] United Nations Environment Programme. Global Mercury Assesment 2013: sources, emissions, releases and environmental transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland (2013) p. 44.
- [7] O. Malm, Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Enviromental Research*. 77 (1998) 73-78.



- [8] OMS. Environmental Health Criteria 101 - Methylmercury. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 1990.
- [9] A. Hoshino, H. Pacheco-Ferreira, S. G. G. Sanches, R. Carvalho, N. Cardoso, M. Perez, V. M. Câmara, Mercury exposure in a riverside Amazon population, Brazil: a study of the ototoxicity of methylmercury. *International Archives of Otorhinolaryngology*. 19 (2) (2015) 135-140.
- [10] C. J. S. Passos, D. Mergler, Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cadernos de Saúde Pública*. 24 (4) (2008) 503-520.
- [11] S. Gandhi, A. Y. Abramov, Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012 (2012) p. 11.
- [12] V. B. Djordjevic, Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*. 237 (2004) 57-89.
- [13] S. P. Wolff, A. Garner, R. T. Dean, Free radicals, lipids and protein degeneration. *Trends in Biochemical Sciences*. 11 (1986) 27-31.
- [14] M. Ramihi-Madiseh, A. Malekpour-Tehrani, M. Bahmani, M. Rafieian-Kopaei, The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9 (9) (2016) 825-831.

- [15] M. Farina, M. Aschner, J. B. Rocha, Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 256 (3) (2011) 405-417 (DOI: 10.1016/j.taap.2011.05.001).
- [16] Y. Oyama, F. Tomiyoshi, S. Ueno, K. Furukawa, L. Chikahisa, Methylmercury-induced augmentation of oxidative metabolism in cerebellar neurons dissociated from the rats: its dependence on intracellular  $Ca^{2+}$ . *Brain Research*. 660 (1994) 154-157.
- [17] D. H. Roos, R. L. Puntel, M. M. Santos, D. O. G. Souza, M. Farina, C. W. Nogueira, M. Aschner, M. E. Burger, N. B. V. Barbosa, J. B. T. Rocha, Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative stress in rat brain cortical slices: involvement of oxidative stress and glutamatergic system. *Toxicol Vitro*. 23 (2009) 302-307.
- [18] Q. H. Wuang, L. J. Yu, Y. Liu, L. Lin, R. Lu, J. Zhu, L. He, Z. L. Lu, Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: a review. *Talanta*. 165 (2017) 709-720.
- [19] E. S. Lima, D. S. P. Abdalla, Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 37 (3) (2011) 293-303.
- [20] K. B. F. Barbosa, N. M. B. Costa, R. C. G. Alfenas, S. O. De Paula, V. P. R. Minim, J. Bressan, Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição (Campinas)*. 23 (4) (2010) 629-643.
- [21] T. Bonnes, T. Guérin, Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? *Biochemical Pharmacology*. 44 (5) (1992) 985-988.

- [22] S. Bellum, K. A. Thuett, B. Bawa, L. C. Abbott, The effect of methylmercury exposure on behavior and cerebellar granule cell physiology in aged mice. *Journal of Applied Toxicology*. 33 (2013) 959-969.
- [23] M. O. Dietrich, C. E. Mantese, G. D. Anjos, D. O. Souza, M. Farina, Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19 (2005) 169-175.
- [24] M. Farina, D. S. Avila, J. B. da Rocha, M. Aschner, Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*. (2012) (DOI: 10.1016/j.neuint.2012.12.006).
- [25] K. Nagashima, Y. Fujii, T. Tsukamoto, S. Nukuzuma, M. Satoh, M. Fujita, Y. Fujioka, H. Akagi, Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathology*. 91 (1995) 72–77.
- [26] V. Glaser, E. M. Nazari, Y. M. Muller, L. Feksa, C. M. Wannmacher, J. B. Rocha, *et al.*, Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 28 (2010) 631-637.
- [27] W. Liu, Z. Xu, Y. Deng, B. Xu, H. Yang, Y. Wey, *et al.*, Excitotoxicity and oxidative damages induced by methylmercury in rat cerebral cortex and the protective effects of tea polyphenols. *Environmental Toxicology*. 29 (2014) 269-283.

[28] M. Xu, G. W. Yip, L. T. Gan, Y. K. Ng, Distinct roles of oxidative stress and antioxidants in the nucleus dorsalis and red nucleus following spinal cord hemisection. *Brain Research*. 1055 (2005) 137-142.

[29] D. J. Brooks, Functional imaging of Parkinson's disease: is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *Journal of Neural Transmission. Supplementa*. 56 (1999) 139-53.

[30] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact in human health. *Pharmacognosy*. 4 (8) (2010) 118-126.

[31] E. S. Manzolli, J. M. Serpeloni, D. Grotto, J. K. Bastos, L. M. G. Antunes, F. Barbosa. , G. R. M. Barcelos, Protective effects of the flavonoid chrysin against methylmercury-induced genotoxicity and alterations of antioxidante status, *in vivo*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015 (2015) 1-7.

[32] E. S. De Paula, M. F. H. Carneiro, D. Grotto, L. C. Hernandez, L. M. G. Antunes, F. Barbosa, Protective effects of niacina against methylmercury-induced genotoxicity and alterations in antioxidante status in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 79 (2016) 174-183.

[33] H. Rogez, Açai: Preparo, composição e melhoramento da conservação, 1ª ed., EDUFPA, Belém, 2000.

[34] O. L. Nogueira, F. J. C. Figueiredo, A. A. Muller, Sistema de Produção - Açai. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2005.

- [35] A. G. Schauss, Xianli Wu, G. S. Jensen, Increased antioxidant capacity and inhibition of lipid peroxidation in healthy adults consuming an açai (*EUTERPE OLERACEA*) fruit-based juice. *Acta Horticulturae*. (2009) (DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.841.9).
- [36] A. Brasil, F. A. Rocha, B. D. Gomes, K. R. Oliveira, T. S. De Carvalho, E. J. Batista, R. D. Borges, J. Kremers, A. M. Herculano, Diet enriched with the Amazon fruit açai (*Euterpe oleracea*) prevents electrophysiological deficits and oxidative stress induced by methylmercury in the rat retina. *Nutritional Neuroscience*. (2016) (DOI: 10.1080/1028415X.2015.1119378).
- [37] J. R. Souza-Monteiro, M. Hamoy, D. Santana-Coelho, G. P. Arrifano, R. S. Paraense, A. Costa-Malaquias, J. R. Mendonça, R. F. Da Silva, W. S. Monteiro, H. Rogez, D. L. De Oliveira, J. L. Do Nascimento, M. E. Crespo-López, Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. *Neurochemistry International*. (2015) (DOI: 10.1016/j.neuint.2015.06.014)
- [38] S. Yee, B. H. Choi, Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Experimental and Molecular Pathology*. 60 (1994) 188-196.
- [39] C. S. Hall, Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *Journal of Comparative Psychology*. 18 (1934) 385-403.
- [40] M. S. S. Aguiar, Análise do comportamento defensivo induzido pela microinjeção do neuropeptídeo substância P na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos. Departamento de Psicologia e Educação, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1995.

[41] N. W. Dunham, T. S. Miya, A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 46 (1957) 208-209.

[42] B. J. Jones, D. J. Robert, The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 20 (1968) 302-304.

[43] N. Ogawa, Y. Hirose, S. Ohara, T. Ono, Y. Watanabe, A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 50 (1985) 435 – 441.

[44] H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. 186 (1990) 407-421.

[45] D. A. M. Zaia, C. T. B. V. Zaia, J. Lichtig, Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*. 21(6) (1998) 787-793.

[46] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok *et al.*, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126 (1982) 131–138.

[47] C. M. G. Bichara, H. Rogez, Açai (*Euterpe oleracea* Martius). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, Açai to Citrus*. 2 (2011) 26-27.

[48] A. P. Dos Santos, M. L. Mateus, C. M. Carvalho, M. C. Batoreu, Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interference of selenomethionine on methylmercury toxicity. *Toxicology Letters*. 169 (2007) 121-128.

[49] M. Yoshida, C. Watanabe, M. Kishimoto, A. Yasutake, M. Satoh, M. Sawada, Y. Akama, Behavioral changes in metallothionein-null mice after the cessation of long-term, low-level exposure to Mercury vapor. *Toxicology Letters*. 161 (2006) 210-218.

[50] J. P. Bourdineaud, M. Laclau, R. Maury-Brachet, P. Gonzalez, M. Baudrimont, N. Mesmer-Dudons, M. Fujimura, A. Marighetto, D. Godefroy, W. Rostène, D. Brèthes, Effects of methylmercury contained in a diet mimicking the Wayana Amerindians contamination through fish consumption: mercury accumulation, metallothionein induction, gene expression variations, and role of the chemokine CCL2. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (6) (2012) 7710-7738.

[51] F. Y. Doré, S. Goulet, A. Gallagher, P. O. Harvey, J. F. Cantin, T. D'aigle, M. E. Mirault, Neurobehavioral changes in mice treated with methylmercury at two different stages of fetal development. *Neurotoxicology and Teratology*. 23 (5) (2001) 463-472.

[52] S. Goulet, F. Y. Doré, M. -E. Mirault, Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicology and Teratology*. 25 (2003) 335-347.

[53] S. Bellum, K. A. Thuett, B. Bawa, L. C. Abbott, The effect of methylmercury exposure on behavior and cerebellar granule cell physiology in aged mice. *Journal of Applied Toxicology*. 33 (9) (2012) 959-969.

- [54] S. T. Grafton, Contributions of functional imaging to understanding parkinsonian symptoms. *Current Opinion in Neurobiology*. 14 (2004) 715–719.
- [55] X. Li, D. Yin, J. Yin, Q. Chen, R. Wang, Dietary selenium protect against redox-mediated immune supression induced by methylmercury exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 72 (2014) 169-177.
- [56] S. MONCADA, A. G. HERMAN, P. VANHOUTTE, Endothelium-derived relaxing fator is identified as nitric oxide. *Trends in Pharmacological Sciences*. 8 (1987) 365-368.
- [57] L. M. S. Dusse, Óxido Nítrico (NO): O desafio de sua determinação. *Laes & Haes*. 1 (1998) 176-184.
- [58] C. F. Huang, C. J. Hsu, S. H. Liu, S. Y. Lin-Shiau, Neurotoxicological mechanisms of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase involved. *Toxicology Letters*. 176 (2008) 188-197.
- [59] C. F. Huang, S. H. Liu, C. J. Hsu, S. Y. Lin-Shiau, Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicology Letters*. 201 (2011) 196-204.
- [60] G. A. Garzón, C. E. Narváez-Cuenca, J. P. Vincken, H. Gruppen, Polyphenolic composition and antioxidante activity of açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food Chemistry*. 217 (2017) 364-372.



[61] V. Mohan, S. Das, S. B. Rao, Hydroxytyrosol, a dietary phenolic compound forestalls the toxic effects of methylmercury-induced toxicity in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Environmental Toxicology*. 31 (10) (2016) 1264-1267.

[62] M. Harada, Minamata Disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*. 25 (1) (1995) 1-24.

[63] S. J. Balogh, M. T. K. Tsui, J. D. Blum, A. Matsuyama, G. E. Woerndle, S. Yano, A. Tada, Tracking the fate of mercury in the fish and bottom sediments of Minamata Bay, Japan, using stable mercury isotopes. *Environmental Science & Technology*. 49 (9) (2015) 5399-5406.

[64] R. C. Rodríguez Martín-Doimeadios, J. J. Berzas Nevado, F. J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, G. P. Arrifano, A. M. Herculano, J. L. Do Nascimento, M. E. Crespo-López, Comparative study of Mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon. *Environmental Science and Pollution Research*. 21 (12) (2014) 7466-7479.

**ANEXO 1 - DECRETO 97.507/89****DECRETO Nº 97.507,  
DE 13 DE FEVEREIRO DE 1989\***

*Dispõe sobre licenciamento de atividade mineral, o uso do mercúrio metálico e do cianeto em áreas de extração de ouro, e dá outras providências.*

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, usando das atribuições que lhe confere o art. 84, inciso IV, da Constituição, DECRETA:

**Art. 1º** As atividades, individual ou coletiva, que realizam extração mineral em depósitos de colúvio, elúvio ou aluvião, nos álveos (placers) de cursos d'água ou nas margens reservadas, bem como nos depósitos secundários, chapadas, vertentes e altos dos morros utilizando equipamentos do tipo dragas, moinhos, balsas, pares de bombas (chupadeiras), bicas ("cobra fumando") e quaisquer outros equipamentos que apresentem afinidades, deverão ser licenciados pelo órgão ambiental competente.

*Parágrafo único.* Será fixado, pelo órgão ambiental competente, prazo para o requerimento de licença das atividades em operação.

**Art. 2º** É vedado o uso de mercúrio na atividade de extração de ouro, exceto em atividade licenciada pelo órgão ambiental competente.

§ 1º Ficam igualmente vedadas as atividades descritas no artigo 1º deste Decreto, em mananciais de abastecimento público e seus tributários e em outras áreas ecologicamente sensíveis, a critério do órgão ambiental competente.

§ 2º É proibido o emprego do processo de cianetação nas atividades descritas no artigo 1º, resguardado o licenciamento do órgão ambiental competente.

**Art. 3º** A criação de reservas garimpeiras deverá ser condicionada a um prévio licenciamento junto ao órgão ambiental competente.

**Art. 4º** O não cumprimento do disposto neste Decreto sujeitará o infrator à imediata interdição da atividade, além das penalidades previstas na legislação vigente.

**Art. 5º** Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

**Art. 6º** Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, 13 de fevereiro de 1989; 168ª da Independência e 101ª da República.

JOSÉ SARNEY – João Alves Filho

\* DO de 14/02/89, pág. 2.282 2.

**ANEXO 2 - DECRETO 97.632/89**

**Presidência da República**  
**Casa Civil**  
**Subchefia para Assuntos Jurídicos**

DECRETO Nº 97.632, DE 10 DE ABRIL DE 1989.

Dispõe sobre a regulamentação do Artigo 2º, inciso VIII, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso das atribuições que lhe confere o artigo 84, inciso IV, da Constituição,

**DECRETA:**

Art. 1º Os empreendimentos que se destinam à exploração de recursos minerais deverão, quando da apresentação do Estudo de Impacto Ambiental - EIA e do Relatório de Impacto Ambiental - RIMA, submeter à aprovação do órgão ambiental competente, plano de recuperação de área degradada.

Parágrafo único. Para os empreendimentos já existentes, deverá ser apresentado ao órgão ambiental competente, no prazo máximo de 180 (cento e oitenta) dias, a partir da data de publicação deste Decreto, um plano de recuperação da área degradada.

Art. 2º Para efeito deste Decreto são considerados como degradação os processos resultantes dos danos ao meio ambiente, pelos quais se perdem ou se reduzem algumas de suas propriedades, tais como, a qualidade ou capacidade produtiva dos recursos ambientais.

Art. 3º A recuperação deverá ter por objetivo o retorno do sítio degradado a uma forma de utilização, de acordo com um plano preestabelecido para o uso do solo, visando a obtenção de uma estabilidade do meio ambiente.

Art. 4º Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.



Art. 5º Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, 10 de abril de 1989; 168º da Independência e 101ª da República.

JOSE SARNEY  
João Alves Filho  
Rubens Bayma Denys

Este texto não substitui o publicado no DOU de 12.4.1989

## ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO PROJETO

	<b>comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação</b>	
---	--	---

PARECER- 91/15

**Projeto** Efeito do açaí (*Euterpe oleracea*) em modelo de intoxicação por metilmercúrio

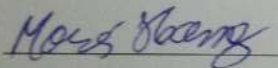
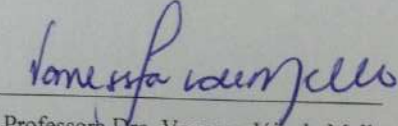
**Coordenador:** Prof. Dra. María Elena Crespo López

**Área Temática:** Ciências Biológicas  
Área: Neurociências

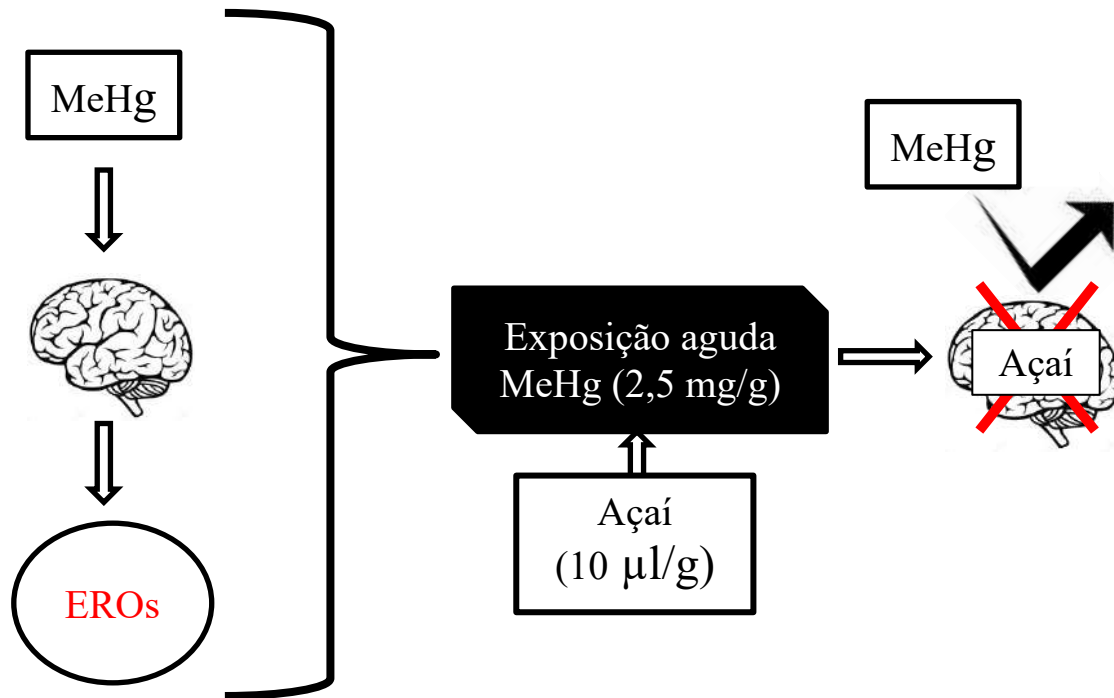
Vigência: 01/2016 à 01/2018

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do (s) modelo (s) animal proposto (s). Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para o tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 0276/2015 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação que correspondem a **90 camundongos Heterogênicos Swiss-machos**, nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

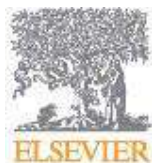
Belém, 03 de dezembro de 2015.

 Professor Dr. Moisés Hamoy Presidente do CEPAE-UFPA	 Professora Dra. Vanessa Jóia de Mello Vice-Presidente do CEPAE- UFPA
---	---

## ANEXO 4 - RESUMO GRÁFICO



## ANEXO 5 - NORMAS DA REVISTA

**FITOTERAPIA**

The Journal for the Study of Medicinal Plants

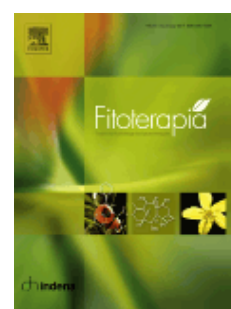
## INFORMATION PACK

AUTHOR

## TABLE OF CONTENTS

---

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



ISSN: 0367-326X

## DESCRIPTION

---

*Fitoterapia* is a Journal dedicated to **medicinal plants** and to **bioactive natural products** of plant origin. It publishes original contributions in seven major areas:

1. Characterization of **active ingredients** of medicinal plants
2. Development of standardization method for bioactive **plant extracts** and natural products
3. Identification of **bioactivity** in plant extracts
4. Identification of targets and mechanism of activity of plant extracts
5. Production and **genomic characterization** of medicinal plants biomass
6. **Chemistry** and **biochemistry** of bioactive natural products of plant origin
7. Critical reviews of the **historical, clinical** and **legal** status of medicinal plants, and accounts on topical issues.

Contributions reporting the following are not normally considered for publication:

1. Activity data on crude extracts that have not been characterized by analysis of their major constituents (HPLC, NMR);
2. Unexceptional and predictable bioactivity (e.g. antioxidant properties of phenolics or antibacterial activity of essential oils);
3. Uncritical ethnopharmacological investigations, where a list of plants and their use are simply recorded.

The following immediate rejection criteria apply:

RULE 1: The manuscript does not fall into any of the areas of interest of the Journal;

RULE 2: The manuscript is too preliminary, reporting e.g. activity data without comparison to a reference, or without a positive control;

RULE 3: The botanical source is not clearly identified, authenticated, and documented (voucher); RULE 4: Bioactivity is not relevant to *in vivo* situations.

The journal encourages Authors to enhance the description of their methodological procedures by **submitting** accompanying multimedia files (video or animation sequences). These files are to be submitted as supplementary material, see below.

*The journal publishes supplements, podcasts and webinars. For sponsorship opportunities please contact [a.pordon@elsevier.com](mailto:a.pordon@elsevier.com).*

## AUDIENCE

---

Pharmacologists, Ethnopharmacologists, Pharmaceutical Scientists, Medicinal Chemists, Organic Chemists, Toxicologists, Botanists and Anthropologists.

## IMPACT FACTOR

---

2015: 2.408 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Reaxys  
CINAHL

Cambridge Scientific Abstracts  
Chemical Abstracts  
MEDLINE®  
International Pharmaceutical Abstracts  
EMBASE  
Natural Products Update/Royal Society of Chemistry  
CAB Abstracts  
Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences  
Scopus  
Science Citation Index Expanded  
EMbiology

---

***Editor-in-Chief:***

**G. Appendino**, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Novara, Italy

***Honorary Advisory Board:***

**E. Bombardelli**, Milano, Italy

**J.B. Calixto**, Florianópolis, Brazil

**E.M. Croom, Jr.**

**R. della Loggia**, Trieste, Italy

**E.L. Ghisalberti**, Nedlands, Western Australia, Australia

**K. Hostettmann**

**P.J. Houghton**, London, UK

**S. Malandrino**, Milano, Italy

***Advisory Board:***

**S. Adekenov**, Karaganda, Kazakhstan

**Y. Asakawa**, Tokushima-Shi, Japan

**G. Delgado**, Mexico City, Mexico

**B. Gabetta**, Milano, Italy

**J. Gertsch**, Bern, Switzerland

**S. Gibbons**, London, UK

**D. Guo**, Shanghai, China

**Y.W. Guo**, Shanghai, China

**M. Hamburger**, Basel, Switzerland

**A. Hensel**, Münster, Germany

**J. Hohmann**, Szeged, Hungary

**I. Khan**, University, Mississippi, USA

**A.D. Kinghorn**, Columbus, Ohio, USA

**S. Kusari**, Dortmund, Germany



**V. Lanzotti**, Naples, Italy

**E. Muñoz**, Cordoba, Spain

**U. Nyman**, Svalov, Sweden

**G.F. Pauli**, Chicago, Illinois, USA

**J.M. Pezzuto**, Hilo, Hawaii, USA

**O. Sterner**, Lund, Sweden

**O. Tagliatalata-Scafati**, Napoli, Italy

**L. Verotta**, Milano, Italy

**R. Verpoorte**, Leiden, Netherlands

**O. Werz**, Jena, Germany

**W.D. Zhang**, Shanghai, China

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

*To find out more, please visit the Preparation section below.*

### INTRODUCTION

*Fitoterapia* is a Journal dedicated to medicinal plants and to bioactive natural products of plant origin. It publishes original contributions into these seven major areas:

1. Characterization of active ingredients of medicinal plants
2. Development of standardization method for bioactive plant extracts and natural products
3. Identification of bioactivity in plant extracts
4. Identification of targets and mechanism of activity of plant extracts
5. Production and genomic characterization of medicinal plants biomass
6. Chemistry and biochemistry of bioactive natural products of plant origin
7. Critical reviews of the historical, clinical and legal status of medicinal plants, and accounts on topical issues.

Article critically reviewing the historical, clinical and legal status of medicinal plants and accounts on topical issues are also welcomed.

#### Contributions reporting

1. Activity data on crude extracts that have not been characterized by analysis of their major constituents (HPLC, NMR)
2. Unexceptional and predictable bioactivity (antioxidant properties of phenolics or antibacterial activity of essential oil)
3. Uncritical ethnopharmacological investigations, where a list of plants and their use are simply recorded are not normally considered for publication.

The following immediate rejection criteria apply:

RULE 1: The manuscript does not fall into any of the areas of interest of the Journal;

RULE 2: The manuscript is too preliminary, reporting e.g. activity data without comparison to a reference, or without a positive control;

RULE 3: The botanical source is not clearly identified, authenticated, and documented (voucher); RULE 4: Bioactivity is not relevant to *in vivo* situations.

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 accepts Reviews, Research papers and Book Reviews.

**Authors are encouraged to draw chemical formulas using the ChemDraw Program and ACS-Style.**

### *Submission 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](#).

### *Declaration of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [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 or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy 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 [CrossCheck](#).

### *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 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 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 Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

### *Open access*

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### *Open access*

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

#### *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.

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

For 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 open access publication fee for this journal is **USD 1800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://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 [green 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 Publishing Campus*

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

*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.

*Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

**Additional information**

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 below, that it is written in good English, includes the electronic version and that the manuscript meets the *Fitoterapia* standard and scope.

*The journal encourages Authors to enhance the description of their methodological procedures by submitting accompanying multimedia files (video or animation sequences). These files are to be submitted as supplementary material, see below.*

**NEW SUBMISSIONS**

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

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word

document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

#### *References*

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

#### *Formatting requirements*

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

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

Divide the article into clearly defined sections.

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

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

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

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

#### *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. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that 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.

### 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 and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Keywords

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

### Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the [PubChem CID](#) of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

[More information](#).

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the



first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

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.

#### *Footnotes*

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

### *Artwork*

***Authors are encouraged to draw chemical formulas using the ChemDraw Program and ACS-Style.***

#### *Electronic Artwork*

##### *General points*

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

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

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.



TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### *Please do not:*

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

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color 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. 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.

#### *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 either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Reference links*

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

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. 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*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. 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.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *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](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor 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.

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/fitoterapia>

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

#### *Reference formatting*

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

#### *Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

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

2000. Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **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 files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. 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.

### **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

### **RESEARCH DATA**

This journal encourages and supports you to share data that underpins 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 are necessary to 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. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data and materials (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](#).

### *Database linking*

Once 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 databases that give them a better understanding of the research described.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

It is also possible to show linked data repository banners on your published article on ScienceDirect. The requirements differ depending on the repository. For more information and a full list of supported databases, visit the [database linking page](#).

For datasets on non-supported repositories please visit [data profile 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 in Brief articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data in Brief 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 Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief 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 is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this form](#) to write your Data in Brief.

### *Transparency*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. You can also include an email address so readers can request data that is unavailable for publication or under embargo. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

For more information on transparency for research data, visit the [xxx page](#).

### *AudioSlides*

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### *Interactive plots*

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

## 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 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](#).