

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA MENDES AMORIM

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E
EFICÁCIA DE *Costus spiralis* (JACQ.) ROSCOE VISANDO SUA POTENCIAL
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Belo Horizonte

2022

JULIANA MENDES AMORIM

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE *Costus spiralis* (JACQ.) ROSCOE VISANDO SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati

Belo Horizonte

2022

A524c Amorim, Juliana Mendes.
Caracterização química e estudos pré-clínicos de segurança e eficácia de *Costus spiralis* (jacq.) Roscoe visando sua potencial aplicação no tratamento da doença renal crônica [recurso eletrônico] / Juliana Mendes Amorim. – 2022.
1 recurso eletrônico (198 f. : il.) : pdf

Orientadora: Rachel Oliveira Castilho.
Coorientadora: Ana Cristina Simões e Silva.
Coorientador: Carlos Alberto Tagliati.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. *Costus spiralis* – Teses. 2. *Amomum* – Teses. 3. Plantas medicinais – Teses. 4. Insuficiência renal crônica – Teses. 5. Carboidratos – Teses. 6. Nefropatias – Teses. 7. Toxicidade aguda – Teses. 8. Citotoxicidade – Teses. I. Castilho, Rachel Oliveira. II. Silva, Ana Cristina Simões e. III. Tagliati, Carlos Alberto. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE *Costus spiralis* (JACQ.) ROSCOE VISANDO SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA”*

JULIANA MENDES AMORIM

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Fabio Carmona
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Profa. Dra. Marina Scopel
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Ana Paula Lucas Mota
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - Orientadora
Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 25 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Carmona, Usuário Externo**, em 25/07/2022, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati, Membro**, em 26/07/2022, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 26/07/2022, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Scopel, Professora do Magistério Superior**, em 27/07/2022, às 22:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Simoes e Silva, Membro de comissão**, em 29/07/2022, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvana Maria Zucolotto Langassner, Usuário Externo**, em 02/08/2022, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1618411** e o código CRC **8D6BB843**.

À minha Ana.

AGRADECIMENTOS

As próximas páginas foram escritas por mim, mas seu conteúdo foi construído a muitas mãos e é um privilégio enorme ter tantas pessoas a quem agradecer. Não apenas pelas contribuições na construção do estudo em si, mas principalmente, pela minha trajetória até aqui.

Com muito carinho, início agradecendo minha orientadora e amiga Profa. Rachel Oliveira Castilho pela troca, confiança e inspiração ao longo de quase treze anos de trabalho. Obrigada por me ajudar a ser uma pessoa, uma pesquisadora e uma professora melhor. Tem sido um grande privilégio aprender e dividir a caminhada com você.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Ana Cristina Simões e Silva pela enorme generosidade em contribuir com este trabalho e com a minha trajetória. Terminei esta etapa, levando algum conhecimento de nefrologia, mas principalmente, um grande exemplo de como orientar de forma gentil e assertiva, e a possibilidade de levar este estudo para mais perto de quem importa.

Ao Prof. Carlos Alberto Tagliati, agradeço a coorientação e suporte na condução dos ensaios *in vivo* de eficácia e segurança. Cresci como pesquisadora e como pessoa ao aprender a trabalhar e respeitar estes seres que tanto contribuem com o desenvolvimento de novos medicamentos.

Agradeço ainda aos meus orientadores por terem me permitido conhecer e trabalhar com seus alunos de pós-graduação, que fazem parte da grande categoria de profissionais que torna a ciência brasileira possível. Deixo meu agradecimento especial aos queridos Kátia Vidal, Larissa Souza, Pedro Franco, Letícia Barbosa e Roberta da Silva Filha pela parceria e pelo exemplo. Agradeço ainda a valiosa colaboração da Profa. Simone Fernandes, do Prof. Ênio Ferreira e dos pesquisadores Mário Izidoro e Stanley Araújo. Sem a colaboração de vocês este trabalho não se tornaria realidade e eu não teria tido a grata oportunidade de ampliar meus conhecimentos e vivências na ciência.

Não poderia deixar de agradecer a todos que fazem parte da equipe Gnosiah. A construção desse grupo é um grande orgulho e foi determinante para minha formação em todos os sentidos.

Obrigada pela troca constante. Agradeço a todos que me auxiliaram de alguma forma na realização deste estudo, especialmente aos meus alunos de iniciação científica Clara, Lara, Vinicius e Luiza, e aos mestrandos e amigos Raquel Aroeira e Gabriel Freire que foram minhas mãos quando elas próprias estavam distantes.

Ainda sobre aqueles que contribuíram com a elaboração desta tese, agradeço aos professores Ana Paula Mota, Marina Scopel, Silvana Langassner, Fábio Carmona, Priscilla Campana e Kátia Daniela da Silveira, membros da banca avaliadora, que generosamente deram importantes contribuições e sugestões não apenas para a elaboração da versão final, mas também para a realização de etapas futuras deste estudo e para minha trajetória enquanto pesquisadora.

Agradeço ainda àqueles que me permitiram colaborar com seus projetos de pesquisa e atividades de ensino e extensão. A minha colaboração foi, com certeza, infinitamente menor do que a contribuição que estas oportunidades deram à minha caminhada. Todas as parcerias construídas ao longo dos últimos anos foram essenciais para meu percurso de doutoramento.

Além dos parceiros acadêmicos, eu não estaria escrevendo estas palavras sem meus parceiros de vida. Alguns também conquistados na academia, e já citados nestas linhas. Junto a eles, agradeço especialmente a minha Isa, que tem sido muito mais do que uma grande amiga e é uma grande inspiração, e às queridas Paula, Nivea, Isabella Kuniko, Rafaela, Laiane e Talita, que me ouviram e me apoiaram tão generosamente durante toda essa caminhada.

E então agradeço a minha família que me permitiu de todas as formas possíveis e imagináveis chegar até aqui. Toda gratidão aos meus amados pais, Célio e Rosa e minha querida irmã Marina, que me deram todos os privilégios que uma pessoa pode ter nessa vida. Eu sou uma pessoa melhor por causa de vocês e pela família que estou construindo.

Sobre minha família em construção, palavras não seriam suficientes para agradecer ao meu marido por ser meu parceiro no sentido mais amplo que essa palavra pode alcançar. Por me apoiar mesmo com a distância, a saudade e até a incompreensão. Por simplesmente escolher estar ao meu lado todos os dias.

Por fim, escrevo para minha Ana, que lerá estas palavras apenas daqui há alguns anos. Você, minha filha, me deu a clareza, o foco e a motivação necessários para concluir esta etapa. Sua companhia diária nos últimos meses me permitiu descansar quando necessário, me tornou mais consciente das minhas limitações, ao mesmo tempo que me permitiu superar muitas delas.

Por fim, agradeço sinceramente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, incluindo as instituições de ensino, pesquisa e fomento, representadas por seus funcionários, que tornaram possível o privilégio de passar pelo processo de doutoramento em uma das melhores universidades federais do Brasil, a qual tenho o prazer de chamar de casa há mais de 16 anos. Obrigada a UFMG, o PPGCF/FAFAR e a CAPES pela oportunidade.

“Ciência se constrói em parceria”

Autora

RESUMO

Costus spiralis (Jacq.) Roscoe (Costaceae) é uma planta medicinal popularmente conhecida no Brasil como Cana do Brejo e tradicionalmente utilizada para o tratamento de doenças renais. Seu uso etnofarmacológico e estudos prévios sugerem uma possível utilidade da espécie no tratamento de doenças renais graves, como a Doença Renal Crônica (DRC), considerada atualmente um problema de saúde pública mundial. Dessa forma, objetivou-se investigar a eficácia e a segurança pré-clínicas de extratos quimicamente caracterizados de folhas de *C. spiralis* visando sua aplicação potencial no tratamento da DRC. A droga e derivados vegetais obtidos foram submetidos a ensaios de caracterização físico-química, tendo sido desenvolvidos novos métodos de identificação e quantificação de marcadores para a espécie. Os extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) apresentaram composição semelhante de flavonas C-glicosiladas totais (média $2,4\% \pm 0,1\%$), mas diferiram significativamente em relação ao conteúdo de carboidratos totais ($41,4\% \pm 1,4\%$ para EAQ e $8,0\% \pm 0,5\%$ para EHE). Os dois extratos foram submetidos a ensaios de toxicidade *in vitro* e apresentaram valores de IC₅₀ que variaram de 74 a 228 µg/mL em avaliação de citotoxicidade em células HepG2 e fibroblastos 3T3-A31. EAQ e EHE foram considerados seguros na dose de 2000 mg/kg em avaliação de toxicidade aguda oral em ratos. Modelo experimental de nefropatia induzida por doxorubicina *in vivo* foi empregado para avaliação do efeito dos extratos na recuperação da função renal. O tratamento com EAQ na dose de 5 mg/kg melhorou significativamente o quadro de comprometimento renal induzido, com redução da proteinúria, da relação massa renal/massa corporal e aumento da captação de ácido dimercaptossuccínico em exame de cintilografia renal. Análise de metabolômica plasmática demonstrou que o modelo experimental estudado afeta principalmente o metabolismo dos ácidos linoleico e linolênico, com alterações dos níveis de ácidos graxos da série ômega-3 e ômega-6, tendo sido observada tendência de reversão desse efeito após tratamento com EAQ. Concluiu-se que o extrato aquoso de *C. spiralis*, rico em flavonoides e carboidratos, apresenta alta segurança pré-clínica após administração oral aguda e potencial para o desenvolvimento de um novo fitoterápico para Doença Renal Crônica, corroborando com o uso tradicional da espécie.

Palavras-chave: *Costus* ssp.; Cana do Brejo; Insuficiência Renal Crônica; flavonas-C-glicosiladas; carboidratos; nefropatia induzida por doxorubicina; toxicidade aguda; citotoxicidade.

ABSTRACT

Costus spiralis (Jacq.) Roscoe (Costaceae) is a medicinal plant popularly known in Brazil as Cana do Brejo and traditionally used for the treatment of kidney diseases. Its ethnopharmacological use and previous studies suggest a possible use of this species in the treatment of severe kidney diseases, such as Chronic Kidney Disease (CKD), currently considered a worldwide public health problem. Thus, we investigated the efficacy and preclinical safety of chemically characterized *C. spiralis* leaf extracts to assess their potential application in the treatment of CKD. The crude plant material and herbal extracts were submitted to physicochemical characterization assays, and new methods of identification and quantification of markers for the species were developed. The aqueous (AQE) and 80% hydroethanolic (HEE) extracts showed similar composition of total *C*-glycosylated flavones (average $2.4\% \pm 0.1\%$) but differed significantly in relation to total carbohydrate content ($41.4\% \pm 1.4\%$ for AQE and $8.0\% \pm 0.5\%$ for HEE). Both extracts were subjected to *in vitro* toxicity assays and showed IC₅₀ values ranging from 74 to 228 $\mu\text{g/mL}$ in cytotoxicity in HepG2 cells and 3T3-A31 fibroblasts. AQE and HEE were found safe at 2,000 mg/kg in acute oral toxicity test in rodents. Experimental model of doxorubicin-induced nephropathy *in vivo* was employed, and the effect of the extracts on recovery of renal function was evaluated. Treatment with AQE at a dose of 5 mg/kg significantly improved the induced renal impairment, with reduced proteinuria, renal mass/body mass ratio and increased dimercaptosuccinic acid uptake on renal scintigraphy. Plasma metabolomics analysis revealed that the experimental model mainly affected the metabolism of linoleic and linolenic acids, altered levels of omega-3 and omega-6 series fatty acids, and indicated a tendency to reverse this effect after treatment with AQE. It was concluded that the flavonoid and carbohydrate-rich aqueous extract from *C. spiralis* leaf presents high preclinical safety after acute oral administration and potential for developing a new herbal medicine for chronic kidney disease, corroborating with the traditional use of the species.

Keywords: *Costus* spp.; Cana do Brejo; Chronic kidney insufficiency; flavones-*C*-glycosylated; carbohydrates; doxorubicin-induced nephropathy; acute toxicity; cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Registros de ocorrência do gênero <i>Costus</i> (Costaceae) em todo o mundo cadastrados no <i>Global Biodiversity Information Facility</i> (GBIF)	27
Figura 2 – Imagens de <i>Costus cuspidatus</i> (A), <i>Costus scaber</i> (B), <i>Costus spicatus</i> (C), <i>Costus arabicus</i> (D) e <i>Costus spiralis</i> (E).....	31
Figura 3 – Imagens de exemplares de <i>Costus spiralis</i> coletadas no Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica	43
Figura 4 – Possíveis estruturas para flavonas C-glicosiladas presentes em folhas de <i>Costus spiralis</i>	48
Figura 5 – Proposta de patogênese de lesão renal na nefropatia induzida pela doxorrubicina	59
Figura 6 – Fotos da estufa da Mata Atlântica da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte/Minas Gerais, onde o material vegetal de <i>Costus spiralis</i> foi coletado.....	66
Figura 7 – Fotos do material vegetal de <i>Costus spiralis</i> coletado na área externa do Jardim de Plantas Medicinais da Atlântica da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte/Minas Gerais	67
Figura 8 – Esquema dos resultados do teste de identificação da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i>	79
Figura 9 – Esquema do procedimento de extração da droga vegetal	81
Figura 10 – Esquema da placa de 96 poços utilizada nos ensaios de avaliação da citotoxicidade de EAQ e EHE.....	94
Figura 11 – Delineamento do experimento piloto (A) e do experimento definido (B) para avaliação do efeito de EAQ e EHE em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina.....	102
Figura 12 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD-UV para folhas de <i>Costus spiralis</i> e espectros de UV dos picos referentes a flavonas C-glicosiladas da apigenina	113
Figura 13 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD/UV para folhas de <i>Costus spicatus</i> e espectros de UV dos picos F1-F10.....	115
Figura 14 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLUE-DAD/UV para folhas de <i>Costus spicatus</i> e <i>Costus spiralis</i>	116
Figura 15 – Cromatoplas obtidos para validação de método para identificação da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	117

Figura 16 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD-UV para folhas e para o extrato hidroetanólico (EHE) de <i>Costus spiralis</i>	119
Figura 17 – Teores de vicenina-2, escafósídeo e flavonas C-glicosiladas totais calculadas como escafósídeo para os extratos de <i>Costus spiralis</i> obtidos utilizando diferentes solventes hidroetanólicos e água	120
Figura 18 – Superfícies de respostas obtidas para o planejamento fatorial fracionário utilizado na otimização do processo extrativo de folhas de <i>Costus spiralis</i>	122
Figura 19 – Cromatogramas obtidos para EAQ, EHE e decocto das folhas de <i>Costus spiralis</i>	124
Figura 20 – Rendimento extrativo e teores de flavonas C-glicosiladas totais, calculadas como escafósídeo para os extratos utilizando diferentes solventes extratores e o decocto obtidos das folhas de <i>Costus spiralis</i>	125
Figura 21 – Cromatoplasmas obtidas para identificação de flavonoides (A), carboidratos (B) e saponinas (C) em EAQ e EHE	128
Figura 22 – Cromatograma obtido para extrato hidroetanólico 80% (EHE) de folhas de <i>Costus spiralis</i> em λ 270 nm	129
Figura 23 – Viabilidade celular da linhagem HepG2 frente ao extrato aquoso (EAQ) (A) e hidroetanólico 80% (EHE) (B) de folhas de <i>Costus spiralis</i>	132
Figura 24 – Viabilidade celular da linhagem fibroblastos 3T3-A31 frente ao extrato aquoso (EAQ) (A) e hidroetanólico 80% (EHE) (B) de folhas de <i>Costus spiralis</i>	133
Figura 25 – Massa dos animais avaliados em modelo de toxicidade oral aguda ao longo do período experimental (dias 0 a 14) em extratos de folhas de <i>Costus spiralis</i>	136
Figura 26 – Escore de distresse dos animais avaliados em modelo de toxicidade oral aguda ao longo do período experimental (dias 0 a 14) em extratos de folhas de <i>Costus spiralis</i>	137
Figura 27 – Porcentagem da massa renal e hepática em relação à massa corporal dos animais avaliados em modelo de toxicidade oral aguda ao final do período experimental (dia 14) em extratos de folhas de <i>Costus spiralis</i>	138
Figura 28 – Massa dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28).....	141
Figura 29 – Consumo alimentar dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao longo do período experimental (dias 1 a 28).....	141

Figura 30 – Balanço hídrico dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28).....	142
Figura 31 – Porcentagem da massa renal/massa corporal e massa renal dos animais avaliados no experimento piloto no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao final do período experimental (dia 28).....	143
Figura 32 – Proteinúria dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28).....	144
Figura 33 – Depuração de creatinina dos animais avaliados no experimento piloto no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao final do período experimental (dia 28).....	145
Figura 34 – Determinação semi-quantitativa da proteinúria (A) e leucocitúria (B) dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28)	146
Figura 35 – Captação de ^{99m} Tc-DMSA obtida por cintilografia renal dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao final do período experimental (dia 28).....	147
Figura 36 – Massa média dos animais avaliados em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)	150
Figura 37 – Porcentagem da massa renal em relação à massa corporal dos animais avaliados em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)	151
Figura 38 – Balanço hídrico dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)	152
Figura 39 – Volume urinário dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)	153
Figura 40 – Proteinúria dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)	154

Figura 41 – Imagens cintilográficas obtidas para os animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)	155
Figura 42 – Captação de ^{99m} Tc-DMSA obtida por cintilografia renal dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)	156
Figura 43 – Depuração de creatinina dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21).....	157
Figura 44 – PLS score plot obtidos (A) e valores de VIP (B) obtidos para análise dos grupos CONTROLE, DOX e DOX +EAQ em modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal	158
Figura 45 – Resultados obtidos por análise univariada dos dados de metabolômica para os grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ no modelo de síndrome de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal.....	159
Figura 46 – Resultados obtidos por análise univariada dos dados de metabolômica para os grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ no modelo síndrome de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal.....	160
Figura 47 – Análise de enriquecimentos de vias obtidos para análise dos grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal	163
Figura 48 – Cortes histológicos obtidos para os animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)	164

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Citações de espécies de <i>Costus</i> nas referências sugeridas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para comprovação da tradicionalidade de uso de plantas medicinais e fitoterápicos	29
Quadro 2 – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies <i>Costus spiralis</i> e <i>Costus spicatus</i> e suas atividades farmacológicas e/ou dos derivados vegetais em que foram descritas	33
Quadro 3 – Histórico dos projetos de pesquisa com a espécie <i>Costus spiralis</i> coordenados pela Profa. Rachel Oliveira Castilho	47
Quadro 4 – Classificação da DRC por etiologia.....	52
Quadro 5 – Classificação e prognóstico de DRC de acordo com a TFG e albuminúria	53
Quadro 6 – Condições empregadas para prospecção fitoquímica realizada para extrato hidroetanólico 80% (EHE) e extrato aquoso (EAQ) de <i>Costus spiralis</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente de eluição empregado para as análises cromatográficas por CLUE-UV/DAD para análise das folhas de <i>Costus spiralis</i>	71
Tabela 2 – Tempos de retenção relativos dos picos de flavonas C-glicosiladas na solução amostra das folhas de <i>Costus spiralis</i>	72
Tabela 3 – Descrição das variáveis para avaliação da robustez do método de para identificação da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i>	74
Tabela 4 – Pontuação para os sintomas de distresse	98
Tabela 5 – Resultados obtidos para caracterização físico-química da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i>	112
Tabela 6 – Resultados de caracterização química para os extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) de <i>Costus spiralis</i>	127
Tabela 7 – Resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) de folhas de <i>Costus spiralis</i> frente a células HepG2 e fibroblastos 3T3-A31 e estimativa da toxicidade oral aguda	132
Tabela 8 – Dados de osmolalidade urinária e plasmática das amostras coletadas, depuração osmolar e de água livre no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao final do período experimental (dia 21).....	157

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ANCA	Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALA	Ácido linolênico
ARA	Ácido araquidônico
BRA	Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DHA	Ácido docosa-hexaenoico
DMEM	Dullbecco's Modified Eagle's médium
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRC	Doença Renal Crônica
DOS	Doxorrubicina
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EAQ	Extrato aquoso das folhas de <i>Costus spiralis</i>
EHE	Extrato hidroetanólico 80% das folhas de <i>Costus spiralis</i>
EHE50%	Extrato hidroetanólico 50% das folhas de <i>Costus spiralis</i>
EHE30%	Extrato hidroetanólico 30% das folhas de <i>Costus spiralis</i>
EM	Espectrometria de Massas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GESF	Glomerulosclerose segmentar e focal
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IL	Interleucina
IFAV	Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal

INMETRO	Instituto de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IP	Intraperitoneal
IRA	Injúria Renal Aguda
IV	Intravenoso
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
LPS	Lipopolissacarídeo
LOS	Losartana
MDCK	Células Madin Darby provenientes de rim canino
MeOH	Metanol
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos/macrófagos-1
MTT	[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio]
NM	Nefropatia Membranosa
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Análise de componentes principais
PLS	Regressão parcial de mínimos quadrados
PG	Patrimônio Genético
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PTF	Produto Tradicional Fitoterápico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
SFB	Soro Fetal Bovino
SN	Síndrome Nefrótica
SNI	Síndrome Nefrótica Idiopática
SNLM	Síndrome Nefrótica por Lesões Mínimas
SUS	Sistema Único de Saúde
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado.
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i> - β (Fator de transformação do crescimento- β)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TRS	Terapia Renal Substitutiva
UV	Espectrometria no ultravioleta/visível

VIP *Variance Importante on Projection*

λ Comprimento de onda

^{99m}Tc Tecnécio 99 m

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	A família Costaceae e o gênero <i>Costus</i>	27
2.1.1	<i>Espécies de Costus utilizadas na medicina popular e/ou tradicional no Brasil.....</i>	30
2.1.1.1	A espécie <i>Costus spiralis</i>	42
2.2	A Doença Renal Crônica	49
2.3	Plantas medicinais no tratamento da Doença Renal Crônica	59
2.4	Desenvolvimento e controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil.....	61
3	OBJETIVOS	65
3.1	Objetivo geral.....	65
3.2	Objetivos específicos.....	65
4	MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1	Condições de cultivo, coleta e identificação botânica dos materiais vegetais	66
4.2	Preparo do material vegetal.....	68
4.3	Caracterização química da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i>	68
4.3.1	<i>Perda por dessecação.....</i>	68
4.3.2	<i>Determinação do índice de espuma</i>	68
4.3.3	<i>Análises cromatográficas por CLUE-UV/DAD.....</i>	69
4.3.3.1	Substâncias químicas de referência	69
4.3.3.2	Preparo das soluções.....	69
4.3.3.3	Condições cromatográficas.....	71
4.3.3.4	Desenvolvimento e validação de método para identificação da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i> por CLUE-UV/DAD.....	71
4.3.3.5	Quantificação de flavonas C-glicosiladas na droga vegetal de <i>Costus spiralis</i>	74
4.3.4	<i>Desenvolvimento e validação de método para identificação da droga vegetal de Costus spiralis por Cromatografia em Camada Delgada.....</i>	76
4.3.4.1	Substâncias químicas de referência	76
4.3.4.2	Preparo das soluções.....	76
4.3.4.3	Condições cromatográficas.....	78
4.3.4.4	Procedimento	78

4.3.4.5 Validação do método	79
4.4 Obtenção de extratos ricos em flavonas C-glicosiladas das folhas de <i>Costus spiralis</i>.	80
4.4.1 Descrição do método extrativo	81
4.4.2 Planejamento experimental para avaliação das condições de extração.....	82
4.4.3 Obtenção de decocto das folhas de <i>Costus spiralis</i>	82
4.5 Análise dos derivados vegetais obtidos por CLUE-UV/DAD	83
4.5.1 Preparo da solução amostra.....	83
4.6 Caracterização química de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i>	84
4.6.1 Perda por dessecação e índice de espuma	84
4.6.2 Prospecção fitoquímica por CCD.....	84
4.6.2.1 Soluções reveladoras	85
4.6.3 Determinação de carboidratos totais	88
4.6.3.1 Preparo das soluções.....	88
4.6.3.2 Procedimento	89
4.6.4 Determinação de taninos.....	89
4.6.4.1 Preparo das soluções.....	89
4.7 Caracterização dos extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i> em ensaio químico de atividade antioxidante	91
4.7.1 Preparo da solução estoque de DPPH.....	91
4.7.2 Preparo da solução estoque das amostras e controle positivo	91
4.7.3 Ensaio do radical 1,1,difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).....	92
4.8 Avaliação da toxicidade pré-clínica de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i>	92
4.8.1 Avaliação da citotoxicidade	93
4.8.1.1 Avaliação da citotoxicidade em células hepáticas.....	93
4.8.1.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método de captação do corante vermelho neutro para a estimativa da toxicidade oral aguda.....	95
4.8.2 Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i>	96
4.8.2.1 Preparo das soluções.....	97
4.8.2.2 Delineamento experimental	97
4.8.2.3 Análises estatísticas	98
4.9 Avaliação do efeito de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i> em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina <i>in vivo</i>	99

4.9.1 Animais	99
4.9.2 Delineamento experimental	99
4.9.3 Análises biométricas	103
4.9.4 Coleta e análise do material biológico	103
4.9.5 Determinação quantitativa de parâmetros de função renal.....	104
4.9.5.1 Determinação da creatinina sérica e urinária.....	104
4.9.5.2 Determinação da proteinúria	105
4.9.5.3 Determinação da osmolaridade sérica e urinária e da depuração osmolar e de água livre	105
4.9.6 Cintilografia renal com ^{99m}Tc-DMSA.....	106
4.9.7 Análises histológicas.....	107
4.9.8 Análise estatísticas para dados biométricos, parâmetros de função renal e cintilografia renal com ^{99m}Tc-DMSA	107
4.9.9 Estudo de metabolômica plasmática	107
4.9.9.1 Preparo das amostras	107
4.9.9.2 Condições cromatográficas.....	108
4.9.9.3 Identificação e quantificação dos metabólitos detectados.....	109
4.9.9.4 Garantia da qualidade dos dados	109
4.9.9.5 Análise estatística	109
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
5.1 Caracterização da droga vegetal de <i>Costus spiralis</i>	111
5.2 Obtenção de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i> ricos em flavonoides	118
5.3 Caracterização química de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i>	127
5.4 Caracterização dos extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i> em ensaio químico de atividade antioxidante	130
5.5 Avaliação da toxicidade pré-clínica de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i>	131
5.5.1 Avaliação da citotoxicidade	131
5.5.2 Avaliação da toxicidade oral aguda.....	134
5.6 Avaliação da eficácia pré-clínicas de extratos das folhas de <i>Costus spiralis</i> em modelo experimental de Doença Renal Crônica	139
5.6.1 Experimento piloto para definição das condições do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina.....	139

<i>5.6.2 Ensaio para avaliação do efeito de EAQ e EHE em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorubicina.....</i>	<i>148</i>
6 CONCLUSÕES.....	171
7 REFERÊNCIAS	173
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, protocolo 129/2019.....	194
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, protocolo 233/2018.....	196

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é a forma mais antiga de cuidado em saúde conhecida pela humanidade e ainda hoje constitui um importante recurso terapêutico para cerca de 80% da população mundial (KO, 1993; MIRALDI; BAINI, 2019). Reconhecendo que diversas comunidades e grupos étnicos, sobretudo nos países em desenvolvimento, dependem da medicina tradicional para seus cuidados básicos em saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde a década de 70, recomenda que sejam criadas políticas de incentivo ao estudo e utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016; BUFAINO, 2013).

No Brasil, a enorme biodiversidade associada à vasta diversidade cultural do país resultou em um rico conhecimento tradicional sobre o manejo e o uso de plantas medicinais, com enorme potencial para ser explorado. Tal fato incentivou o Ministério da Saúde, seguindo as diretrizes internacionais, a elaborar, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2016; BUFAINO, 2013; LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021). O objetivo da política é:

[...] garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. (BRASIL, 2016, p. 24).

A fim de cumprir esse objetivo foi formulado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), o qual reúne uma série de ações visando o incentivo e a regulação do uso medicinal de espécies vegetais e seus derivados. Uma dessas ações foi a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), uma lista de 71 espécies vegetais, nativas ou adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, com potencial para gerar produtos de interesse para o Sistema Único de Saúde (SUS). O objetivo da lista é orientar a condução de estudos que possam investigar o uso medicinal dessas espécies e subsidiar a elaboração de uma relação de fitoterápicos seguros e efetivos para o uso da população brasileira (BRASIL, 2022; LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021).

O gênero *Costus*, amplamente utilizado na medicina tradicional brasileira, foi incluído na RENISUS de forma genérica como *Costus* ssp. Dentre as espécies do gênero nativas ou adaptadas no país destaca-se o uso medicinal de *Costus spiralis*, popularmente conhecida como Cana do Brejo ou Cana de Macaco, para o tratamento de afecções inflamatórias e dos sistemas urinário e reprodutor (CORRÊA, 1984; CRUZ, 1982; DE LA CRUZ, 2008; LORENZI; MATOS, 2021). A ampla utilização *C. spiralis*, assim como de outras espécies do gênero, ressalta a importância de investigar seu uso medicinal a fim de viabilizar sua utilização racional, conforme objetivo proposto pelo Ministério da Saúde.

O uso popular de *Costus spiralis* no tratamento de doenças renais e inflamatórias já foi investigado em estudos pré-clínicos, os quais demonstraram a atividade da espécie na redução de cálculos renais e na recuperação da função renal após indução de nefrotoxicidade em ratos, além de um promissor efeito anti-inflamatório em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. É consistente na literatura a identificação de flavonoides que, segundo alguns autores, estão relacionados às atividades farmacológicas já demonstradas. Outros metabólitos como saponinas esteroidais, taninos, triterpenos e esteroides já foram identificados na espécie, porém, sua relação com os efeitos observados ainda não está clara (AMORIM, 2013; AMORIM *et al.*, 2022; ANTUNES; DA SILVA; PARENTE, 2000; ARAÚJO VIEL *et al.*, 1999; CASTILHO *et al.*, 2021; DA SILVA; PARENTE, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; GARCIA, 2011).

Além da importância fundamental de subsidiar o uso etnofarmacológico de *Costus spiralis*, a investigação do uso medicinal da espécie se apresenta como uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos destinados ao tratamento de doenças renais graves, as quais apresentam grande relevância na atualidade e carecem de alternativas terapêuticas eficazes, não invasivas e de baixo custo (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; JOYCE *et al.*, 2017; KALANTAR-ZADEH *et al.*, 2021).

As doenças renais estão entre as causas mais importantes de óbito e de incapacidade no mundo. Estima-se que mais de 10% da população mundial seja acometida por formas graves de doenças renais, a grande maioria com diagnóstico de Doença Renal Crônica (DRC). A alta mortalidade e morbidade associada às nefropatias, os custos elevados e as complicações decorrentes das

internações e terapias de substituição renal justificam a investigação de novas e múltiplas abordagens terapêuticas para manejo dessas doenças, principalmente, de forma preventiva ou em seus estágios iniciais (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; BIKBOV *et al.*, 2020; JAGER *et al.*, 2019; KOVESDY, 2022; LEWINGTON; CERDÁ; MEHTA, 2013).

Pesquisadores ressaltam a importância da pesquisa de produtos naturais para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para doenças renais, destacando-se a DRC, principalmente devido ao seu caráter multifatorial. Neste sentido, os fitoterápicos são considerados particularmente promissores, uma vez que podem atuar em múltiplos alvos de forma sinérgica, além de serem mais bem tolerados que os medicamentos convencionais e do seu uso representar um valor cultural para diversas comunidades (CARMONA; PEREIRA, 2013; CHEN *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2009; MIRALDI; BAINI, 2019).

Desta forma, objetivou-se com o presente estudo obter extratos quimicamente caracterizados de *Costus spiralis* e submetê-los a ensaios pré-clínicos para avaliação da sua segurança e eficácia visando sua potencial aplicação no tratamento da DRC. Destaca-se que o estudo atende aos objetivos da PNPMF, uma vez que contribui com o uso etnofarmacológico de uma planta medicinal nativa e com o desenvolvimento da cadeia produtiva de fitoterápicos no país.

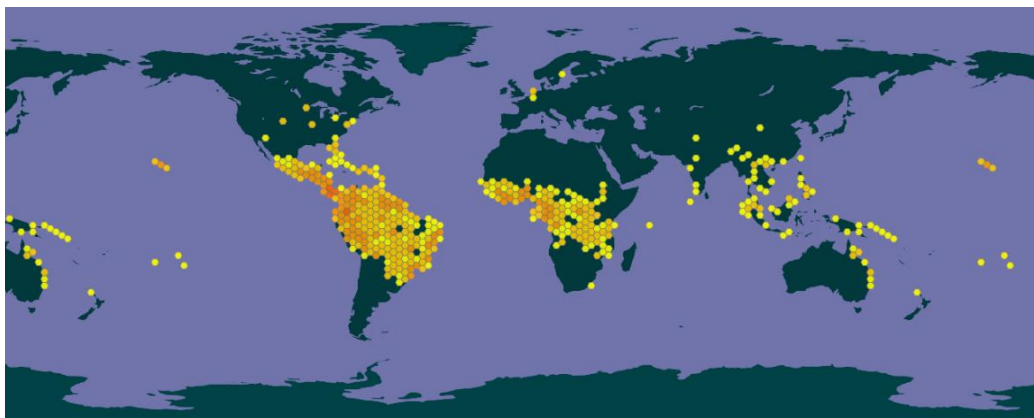
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Costaceae e o gênero *Costus*

A família Costaceae, pertencente a ordem Pantropical Zinziberales, compreende, segundo Tomlinsin (1962 citado por SPECHT, 2006), sete gêneros: *Tapeinochilos*, *Monocostus*, *Dimerocostus*, *Cheilostus*, *Chamaecostus*, *Paracostus* e *Costus*. O mesmo autor foi responsável por sua recente classificação como uma família independente. Antes de 1962 os gêneros dessa família eram classificados na família Zingiberaceae. Porém, Tomlinsin afirmou que as semelhanças existentes entre as duas famílias decorriam apenas de uma ancestralidade comum, sugerindo que Costaceae fosse considerada uma família independente. Atualmente ainda são encontrados estudos que utilizam a classificação anterior, o que pode gerar confusão na análise de trabalhos com espécies da família (SPECHT, 2006; TOMLINSON, 1962).

Aproximadamente 120 espécies compõem a família Costaceae, as quais encontram-se principalmente distribuídas nas regiões tropicais de todos os continentes do planeta (**Figura 1**). No Brasil, são encontrados três gêneros *Costus*, *Chamaecostus* e *Dimerocostus*, totalizando 23 espécies, denominadas por 29 diferentes sinônimos botânicos (ANDRÉ, 2022; MAAS, 1977; SPECHT; STEVENSON, 2006).

Figura 1 – Registros de ocorrência do gênero *Costus* (Costaceae) em todo o mundo cadastrados no *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF)



Fonte: GBIF Secretariat - *Costus* L. (2021).

O gênero *Costus* é o maior da família Costaceae, com 90 espécies em todo o mundo. Esse gênero também é o principal da família encontrado no Brasil, com registros de 15 espécies distribuídas em todo o território nacional (ANDRÉ, 2022; MAAS, 1977; SPECHT; STEVENSON, 2006). Suas espécies, assim como dos demais gêneros da família Costaceae, são amplamente utilizadas para fins ornamentais em todo o mundo, mas também apresentam significativo uso medicinal popular e/ou tradicional em vários países para diferentes doenças e condições (ROCHA *et al.*, 2021; SPECHT, 2006). Destaca-se seu amplo uso medicinal no Brasil, com registros de sua utilização pelos povos indígenas desde o século XVII (ALVES, 2013; BREITBACH *et al.*, 2013; DATAPLAMT, 2019; ROCHA *et al.*, 2021).

Na resolução nº 26 de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) consta uma lista de 67 referências sugeridas para comprovação da tradicionalidade de uso de plantas medicinais e fitoterápicos para fins de registro de Produtos Tradicionais fitoterápicos no Brasil (ANVISA, 2014a). Em consulta às referências citadas, dentre os textos completos disponíveis, encontrou-se 9 citações de espécie de *Costus* e/ou de seus nomes populares no Brasil (Cana do brejo e Cana de macaco), que foram resumidas no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Citações de espécies de *Costus* nas referências sugeridas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para comprovação da tradicionalidade de uso de plantas medicinais e fitoterápicos

Espécie	Resumo das atividades farmacológicas e/ou indicações populares e tradicionais citadas	Referências
<i>Costus spicatus</i>	Extratos alcoólicos de folhas e raiz de <i>Costus spicatus</i> apresentam atividade antimicrobiana em estudo pré-clínicos.	Borrás (2003)
<i>Costus spicatus</i>	Estudos pré-clínicos com extratos de <i>C. spicatus</i> demonstraram atividade analgésica, antiedematogênica e antiespasmódica.	Brasil (2006)
<i>Costus spicatus</i>	Indicações populares: depurativa, adstringente, diurética, tônica, emenagoga e diaforética, gonorreia, sífilis, nefrite, picada de insetos, leucorreia e irritação vaginal, tratamento da bexiga, diabetes e úlceras. Utiliza-se internamente o suco das hastes frescas diluídas em água fervente. Externamente utiliza-se o decocto ou infuso. O chá das raízes e dos rizomas é usado como diurético, tônico, emenagogo e diaforético.	Baracuhy <i>et al.</i> (2014)
<i>Costus spiralis</i> e <i>Costus spicatus</i>	Indicações populares: afecções urinárias: infecções, cistite, nefrite, litíase renal, albuminúria, disúria - como diurético, depurativa e litagoga. Tosse com catarro amarelo: como o peitoral, tumores cutâneos e contusões: como resolutiva amenorreia: como emenagoga. A tintura das raízes ou hastes e o decocto ou infuso das folhas é utilizado para afecções urinárias e amenorreia. O infuso com mel é usado nas tosses. Para doenças venéreas (sífilis, leucorreia e gonorreia) utiliza-se o suco (uso interno) e o banho das hastes (uso externo) diluído em água. As folhas vaporizadas em banho-maria são usadas como cataplasma emolientes em contusões e tumores. A planta também pode ser utilizada na forma de extrato fluido para as indicações citadas.	Lima (2008)
<i>Costus spicatus</i>	Indicada popularmente como anti-helmíntico, carminativo (contra gases), antisséptico, diaforético, diurético, emenagogo, litíase e estimulante. Indicações populares: hemorragia (gonorreia), câncer, coqueluche, tosse, disúria (dor ao urinar), febre, gripe, gases, pedra nos rins, infecção, gonorreia, reumatismo, leucorreia, nefrose, uretrite, vermes. No Brasil o cataplasma é utilizado contra tumores.	Duke (2008)
<i>Costus scaber</i>	Indicada popularmente para: biliosidade, hemorragia (gonorreia), bronquite, febre, gripe, calos, gastrite, hepatite, infecção, leucorreia, picada de cobra, dor de estômago, vaginite, vermes.	Duke (2008)
<i>Costus spiralis</i>	Indicadas popularmente para afecções do trato urinário e genital, anemia, resfriados, dores de garganta, disenteria e diarreia.	Lorenzi e Matos (2021)
<i>Costus speciosus</i>	Indicado na Medicina Tradicional indiana para condições febris, tosse, doenças da pele, retenção da placenta, sangramento pós-parto.	Gruenwald, Brendler e Jaenicke (2000)
<i>Costus</i> ssp.	A cana do brejo (nome popular para espécies de <i>Costus</i> no Brasil) é citada como diurética.	Bieski e De La Cruz (2005)

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Uma revisão integrativa publicada em 2021 reuniu estudos fitoquímicos e pré-clínicos realizados com espécies do gênero entre os anos de 2010 e 2021. Foram incluídos no estudo 21 artigos que investigaram as seguintes espécies: *Costus afer*, *Costus arabicus*, *Costus igneus*, *Costus pictus*, *Costus speciosus*, *Costus spicatus* e *Costus spiralis*. As principais atividades

farmacológicas demonstradas para as espécies foram atividade anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana e para cálculos renais. Em relação a sua composição química, foram encontrados estudos para as espécies *Costus speciosus*, *Costus spicatus*, *Costus spiralis* e *Costus arabicus*, destacando-se principalmente a presença de flavonoides, saponinas, taninos e triterpenos (ROCHA *et al.*, 2021).

Os registros do uso popular e tradicional de espécies de *Costus*, assim como suas atividades farmacológicas já demonstradas, sugerem a necessidade de mais estudos com espécies do gênero para investigação do seu uso etnofarmacológico, contribuindo para maior segurança de sua utilização, assim como para o desenvolvimento de novos medicamentos. No Brasil o gênero foi incluído na RENISUS, em reconhecimento ao seu amplo uso popular e potencial farmacológico, indicando a necessidade de que pesquisadores brasileiros estudem as espécies encontradas no Brasil, as quais serão apresentadas em maiores detalhes no item a seguir (BRASIL, 2022).

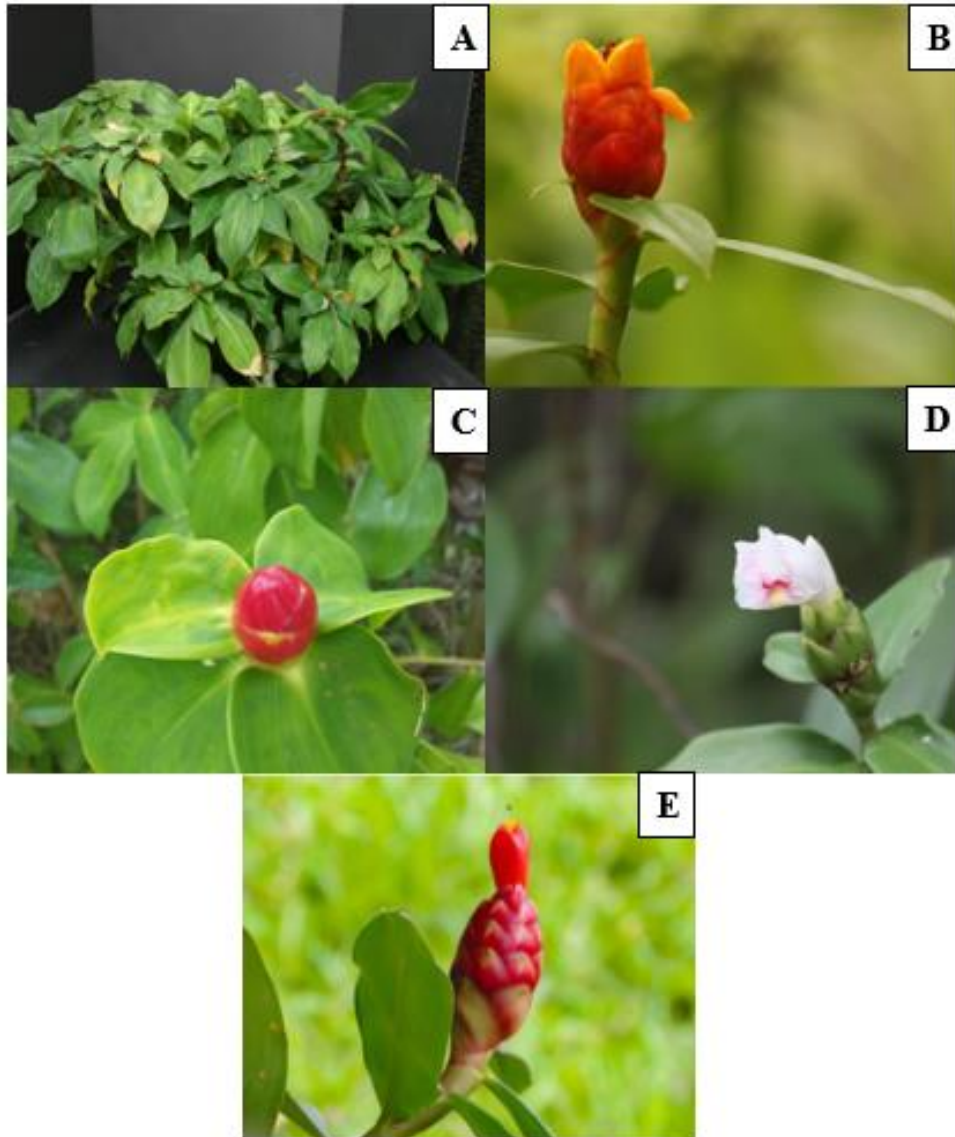
2.1.1 Espécies de Costus utilizadas na medicina popular e/ou tradicional no Brasil

Dentre as 15 espécies de *Costus* que ocorrem no Brasil, encontram-se principalmente registros do uso medicinal das espécies *Costus spiralis*, *Costus spicatus*, *Costus scaber*, *Costus cuspidatus* e *Costus arabicus* (**Figura 2**). De maneira geral, provavelmente em decorrência das suas similaridades morfológicas, essas espécies são conhecidas pelos mesmos nomes populares, principalmente Cana do Brejo e Cana de Macaco. São utilizadas de forma indiscriminada para o tratamento das mesmas doenças, como é possível observar no **Quadro 1**, destacando-se doenças relacionadas ao sistema geniturinário (BARACUHY *et al.*, 2014; BIESKI; DE LA CRUZ, 2005; BORRÁS, 2003; CORRÊA, 1984; CRUZ, 1982; DE LA CRUZ, 2008; DUKE, 2008; GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2000; LIMA, 2008; LORENZI; MATOS, 2021).

Registros de naturalistas e pesquisadores relatam o uso das espécies desde o século XVII, na época conhecida pelos indígenas por Iacucanga ou Paco caatinga, as quais, segundo os registros,

seriam provavelmente *Costus spiralis* e *Costus spicatus* (ALVES, 2013; DATAPLAMT, 2019; LORENZI; MATOS, 2021).

Figura 2 – Imagens de *Costus cuspidatus* (A), *Costus scaber* (B), *Costus spicatus* (C), *Costus arabicus* (D) e *Costus spiralis* (E)



Fonte: GBIF Secretariat - *Costus arabicus* L.; *Costus cuspidatus* (Nees & Mart.); *Costus scaber* Ruiz & Pav.; *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (2021).

Embora o número de trabalhos com as espécies de *Costus* tenha aumentado nos últimos anos, ainda é necessário avançar na caracterização química e farmacológica dessas espécies, assim como investir em estudos clínicos. Em relação à composição química, diferentes classes de

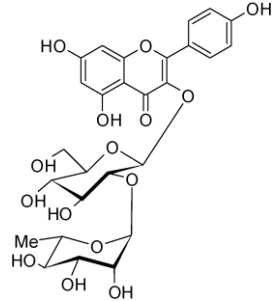
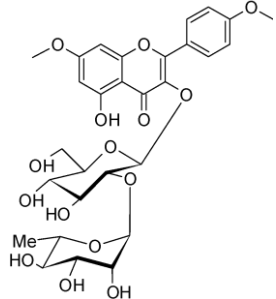
metabólitos são descritas. Porém, relatos do isolamento e/ou elucidação estrutural concentram-se na descrição de flavonoides nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus*, conforme apresentado no **Quadro 2**, demonstrando relativa similaridade química entre as duas espécies. As substâncias isoladas ou os derivados vegetais em que elas foram identificadas mostraram-se ativos em modelos experimentais de inflamação, hiperglicemia e diabetes, levando os autores a sugerirem que os efeitos observados estariam relacionados à presença desses metabólitos (**Quadro 2**).

De maneira geral, trabalhos acerca da atividade farmacológica e de toxicidade foram realizados principalmente para essas duas espécies, encontrando-se ainda alguns estudos científicos com a espécie *Costus arabicus*. Uma breve descrição dos estudos encontrados para as espécies *C. spicatus* e *C. arabicus* estão descritos a seguir. A espécie *Costus spiralis*, objeto do presente estudo, será apresentada separadamente com maiores detalhes no item 2.1.1.1.

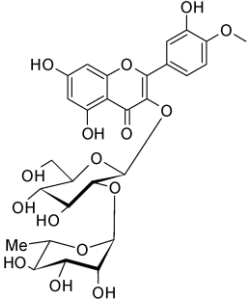
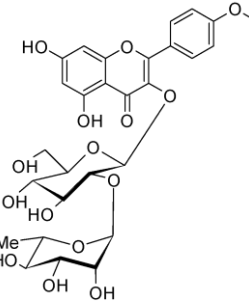
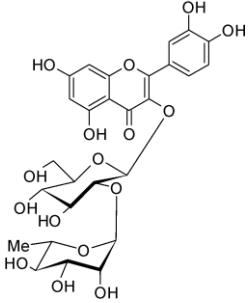
Investigações fitoquímicas conduzidas com a espécie *Costus spicatus* identificaram diferentes classes de metabólitos secundários na espécie, incluindo substâncias fenólicas, principalmente flavonoides, além de ácidos orgânicos, saponinas, polissacarídeos, pectinas, mucilagem, taninos e heterosídeos cianogênicos (DA SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000; DA SILVA; PARENTE, 2002; LORENÇONE *et al.*, 2021; PAES; MENDONÇA; CASAS, 2013).

Algumas das substâncias isoladas da espécie tiveram suas atividades investigadas. Os flavonoides heterosídeos tamarixetina-3-O-neohesperidosídeo, canferídeo-3-O-neohesperidosídeo e quercetina-3-O-neohesperidosídeo, isolados de extrato metanólico das folhas de *C. spicatus* apresentaram atividade inibidora da produção de óxido nítrico por macrófagos ativados *in vitro* de forma dose-dependente (**Quadro 2**) (DA SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000).

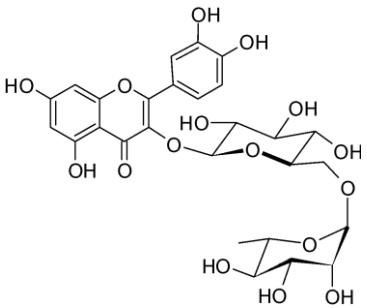
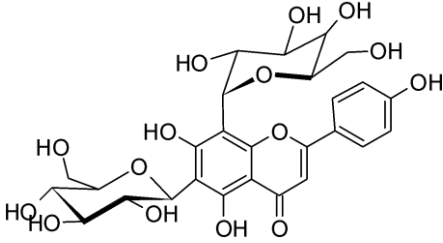
Quadro 2 – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou dos derivados vegetais em que foram descritas

Substância isolada/identificada	Espécies/parte da planta	Atividade farmacológica da substância e/ou derivado vegetal em que ela foi identificada	Referências
Flavonoides			
 <p>canferol-3-<i>O</i>-neohesperosídeo</p>	<i>Costus spiralis</i> (folhas)	Avaliação farmacológica não foi realizada.	Antunes, Da Silva e Parente (2000)
 <p>3,5-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3-<i>O</i>-neohesperosídeo</p>			

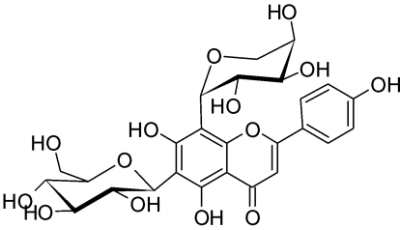
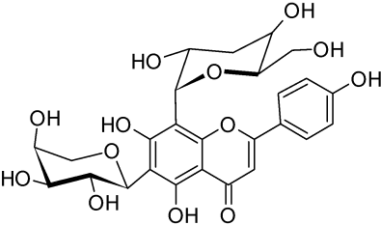
Quadro 2 (continuação) – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou de derivados vegetais em que foram identificadas

 <p>tamarixetina-3-O-neohesperidosídeo</p>			
 <p>canferídeo-3-O-neohesperidosídeo</p>	<p><i>Costus spicatus</i> (folhas); <i>Costus spiralis</i> (folhas)</p>	<p>Inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos ativado coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB-c. Foram avaliadas concentrações de 0 a 100 µmol/L dos flavonoides isolados.</p>	<p>Da Silva, Bernardo e Parente (2000); Antunes, Da Silva e Parente (2000)</p>
 <p>quercetina-3-O-neohesperidosídeo</p>			

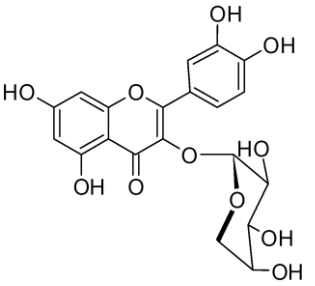
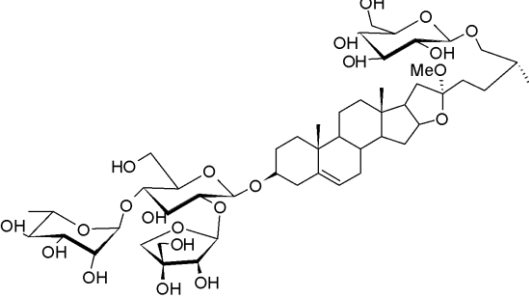
Quadro 2 (continuação) – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou de derivados vegetais em que foram identificadas

 <p>Rutina</p>	<p><i>Costus spicatus</i> (folhas)</p>	<p>Atividade nefroprotetora de fração etanólica (30, 100 e 300 mg/kg) de <i>C. spicatus</i> por via oral em modelo de injúria renal aguda (IRA) por rabdomiólise. A fração também inibiu a formação de cristais de oxalato de cálcio em amostras de urina de humanos saudáveis de forma dose dependente (0,05, 0,50 e 5,0 mg/mL). Na fração foram identificadas rutina, vicenina-2 e outras flavonas C-glicosiladas da apigenina cujas estruturas exatas não foram determinadas.</p>	<p>Moreno <i>et al.</i> (2021)</p>
 <p>Vicenina-2</p>	<p><i>Costus spiralis</i> (folhas)</p>	<p>Atividade de extrato hidroetanólico 80% de <i>C. spiralis</i> na recuperação da função renal em modelo de nefrotoxicidade por cisplatina (5, 15 e 30 mg/kg) por via oral em ratos Wistar. No extrato foram identificadas vicenina-2, escafosideo e outras quatro flavonas C-glicosiladas da apigenina cujas estruturas exatas não foram determinadas.</p>	<p>Amorim <i>et al.</i> (2022)</p>

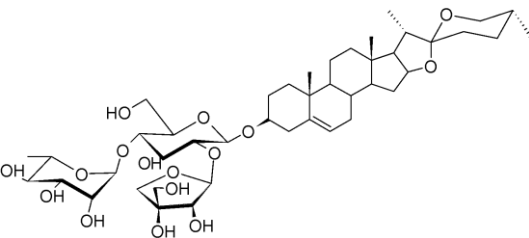
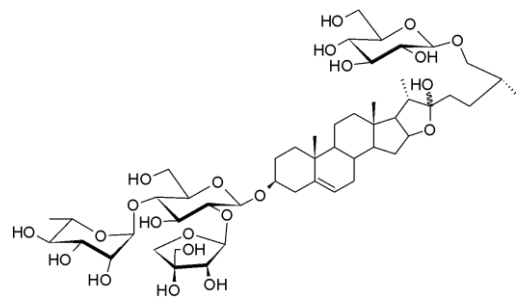
Quadro 2 (continuação) – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou de derivados vegetais em que foram identificadas

 <p>Escafosídeo</p>	<p><i>Costus spiralis</i> (folhas)</p>	<p>Atividade de extrato hidroetanólico 80% de <i>C.spiralis</i> na recuperação da função renal em modelo de nefrotoxicidade por cisplatina (5, 15 e 30 mg/kg) por via oral em ratos Wistar. No extrato foram identificadas vicenina-2, escafosídeo e outras quatro flavonas C-glicosiladas da apigenina cujas estruturas exatas não foram determinadas.</p>	<p>Amorim <i>et al.</i> (2022)</p>
 <p>Isoescafosídeo</p>		<p>Atividade antiedematogênica da substância isolada (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg), da fração acetato de etila metanol (5, 50 e 500 mg/kg) e extrato etanólico contendo escafosídeo por via oral (500 e 1000 mg/kg) por via oral em camundongos Swiss.</p>	<p>Garcia (2011)</p>
		<p>Inibição da enzima α-glicosidase por uma fração eluída com acetato de etila a partir de fracionamento do extrato metanólico de <i>Costus spiralis</i> ($IC_{50} = 408,40$ mg/mL) e pelos isômeros escafosídeo ($IC_{50} = 954,12$ mg/mL) e isoescafosídeo ($IC_{50} = 910,50$ mg/mL) isolados desta fração.</p>	<p>De Oliveira <i>et al.</i> (2018)</p>

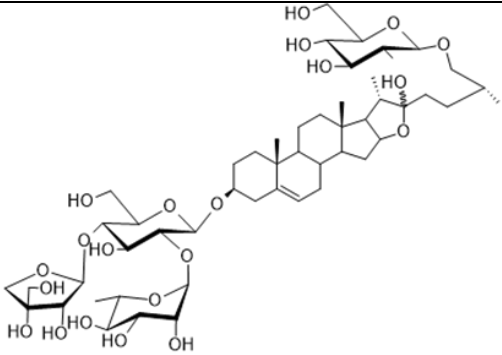
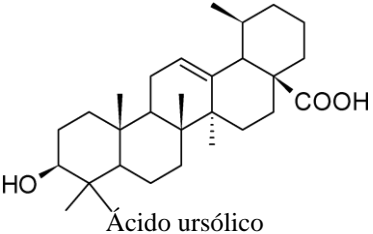
Quadro 2 (continuação) – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou de derivados vegetais em que foram identificadas

 <p>Guajaverina</p>	<p><i>Costus spiralis</i> (folhas)</p>	<p>Diminuição da tolerância à glicose e inibição da peroxidação lipídica pelo pó das folhas (1,25 mg/kg), extrato metanólico (250 mg/kg) e guajaverina (1,5 e 25 mg/kg) isolada deste extrato, em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina em ratos por via oral.</p>	<p>Duarte <i>et al.</i> (2018)</p>
<p>Saponinas</p>			
 <p>(3-β,-22-α,-25R-)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio-β-D-furanosil-(1→4)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Costus spicatus</i> (rizomas)</p>	<p>Inibição da atividade da enzima da Na⁺ATPase no túbulo proximal de rins de cobaias em modelo experimental <i>ex vivo</i> (concentrações de 10⁻⁵ a 10⁻¹⁰ mol/L, com efeito máximo em 10⁻⁶). O valor IC₅₀ obtido por extrapolação foi de 10⁻⁸ mol/L.</p>	<p>Souza <i>et al.</i> (2004)</p>

Quadro 2 (continuação) – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou de derivados vegetais em que foram identificadas

 <p>(-3-β,-22-α,-25R)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio-β-D-furanosil-(1→2)-O-[6-deoxi-α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Costus spicatus</i> (rizomas)</p>	<p>Inibição da atividade da enzima da Na⁺ATPase no túbulo proximal de rins de cobaias em modelo experimental <i>ex vivo</i> (concentrações de 10⁻⁸ a 10⁻⁹ mol/L). O valor de IC₅₀ obtido por extrapolação foi de 10⁻⁹ mol/L.</p>	<p>Souza <i>et al.</i> (2004)</p>
 <p>3β,25R)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxifurost-5-en-3-il-O-D-apio-β-D-furanosil-(1→2)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Costus spiralis</i></p>	<p>Inibição da permeabilidade capilar induzida pela administração de ácido acético na dose de 100 μg/kg por via oral em camundongos BALB/c.</p>	<p>Da Silva e Parente (2004)</p>

Quadro 2 (continuação) – Substâncias isoladas e/ou identificadas nas espécies *Costus spiralis* e *Costus spicatus* e suas atividades farmacológicas e/ou de derivados vegetais em que foram identificadas

 <p>3β,25<i>R</i>)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxiurost-5-en-3-il-<i>O</i>-D-apio-β-D-furanosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-[α-L-rannopiranosil-(1\rightarrow4)-β-D-glicopiranosideo</p>	<p><i>Costus spiralis</i> (rizomas)</p>	<p>Inibição da permeabilidade capilar induzida pela administração de ácido acético na dose de 100 μg/kg por via oral em camundongos BALB/c</p>	<p>Da Silva e Parente (2004)</p>
<p>Outras substâncias</p>			
<p>Polissacarídeos glucanos</p>	<p><i>Costus spiralis</i> (rizomas)</p>	<p>Inibição da permeabilidade vascular e estímulo da fagocitose m modelo de indução da permeabilidade vascular com ácido acético na dose de 50 mg/kg administrada por injeção intraperitoneal.</p>	<p>Da Silva e Parente (2002)</p>
 <p>Ácido ursólico</p>	<p><i>Costus spiralis</i> (folhas)</p>	<p>Atividade antiedematogênica de fração hexânica (500 mg/kg) obtida a partir de extrato etanólico de <i>C. spiralis</i> por via oral em camundongos Swiss. O ácido ursólico foi identificado na fração.</p>	<p>Garcia (2011)</p>

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Três polissacarídeos glucanos obtidos dos caules frescos de *Costus spicatus* inibiram a permeabilidade vascular e apresentaram propriedades estimulantes da fagocitose em modelo *in vivo* de indução da permeabilidade vascular com ácido acético (**Quadro 2**) (DA SILVA; PARENTE, 2002).

Por fim, duas saponinas esteroidais isoladas a partir dos rizomas de *Costus spicatus* mostraram-se capazes de inibir exclusivamente a atividade da Na⁺ATPase no túbulo proximal de rins de cobaias em modelo experimental *ex vivo*. As saponinas identificadas como 3-β,-22-α,-25R-)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio-β-D-furanosil-(1→4)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-glicopiranosídeo e (-3-β,-22-α,-25R-)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio-β-D-furanosil-(1→2)-O-[6-deoxi-α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glicopiranosídeo apresentaram valores de IC50 de a 10⁻⁸ e 10⁻⁹, respectivamente (**Quadro 2**). Segundo os autores os resultados evidenciam que o uso popular da espécie como diurético pode estar associado às saponinas presentes (SOUZA *et al.*, 2004).

Em relação às atividades farmacológicas investigadas para derivados vegetais de *Costus spicatus* destaca-se a investigação de seus efeitos anti-inflamatórios. Extrato metanólico das folhas da espécie apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg por via oral, em modelos de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e calor e em modelo de edema de pata induzido por carragenina (QUINTANS JÚNIOR *et al.*, 2010). Em um estudo mais recente, avaliou-se o efeito de extrato aquoso das folhas secas da espécie em edema, peritonite, nocicepção, coagulação e hemorragia em camundongos e atividade hemolítica indireta *in vitro* induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox*, uma serpente conhecida como jararaca-do-norte. O extrato, em diferentes doses (1,25, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 mg/kg) apresentou atividade antiedematogênica e antinociceptiva após injeção subcutânea na pata dos animais, não apresentando efeito sob os demais parâmetros avaliados (PICANÇO *et al.*, 2016).

Extrato etanólico das folhas de *Costus spicatus* nas doses de 30 mg/kg e 300 mg/kg também demonstrou potencial atividade para tratamento da aterosclerose em modelo experimental utilizando ratas fêmeas submetidas a dieta aterogênica, mediada, segundo os autores, por mecanismos anti-inflamatórios, antioxidantes, além de efeitos hipolipidêmicos. No trabalho,

avaliou-se ainda a função renal dos animais, constatando-se que as ratas que desenvolveram aterosclerose e não foram tratadas com o extrato exibiram uma redução significativa do pH, densidade, e excreção de cloreto urinários quando comparado ao grupo controle. Essas alterações foram revertidas com a administração oral do extrato, que também provocou aumento da eliminação de urina em relação ao grupo controle. É importante citar ainda que nesse mesmo estudo, o extrato foi avaliado em relação a toxicidade oral aguda, mostrando-se seguro em uma dose de 2000 mg/kg, sendo este um dos poucos relatos sobre a segurança pré-clínica da espécie (LORENÇONE *et al.*, 2021).

Recentemente, Moreno e colaboradores (2021) investigaram o uso etnofarmacológico de *Costus spicatus* em afecções renais. Os autores avaliaram a atividade nefroprotetora em modelo experimental de injúria renal aguda induzida (IRA) por rabdomiólise e sua capacidade de inibir a formação de cristais de oxalato de cálcio em urina de sujeitos saudáveis de uma fração solúvel em etanol obtida do infuso das folhas da espécie. Segundo os autores a fração apresentou atividade nefroprotetora nas três doses avaliadas (30 mg/kg/ 100 mg/kg e 300 mg/kg) com redução de danos histológicos e da oligúria gerados pela indução da rabdomiólise (**Quadro 2**). Em animais saudáveis, no entanto, a fração não apresentou efeito sob a diurese (MORENO *et al.*, 2021).

Nesse mesmo trabalho, a fração etanólica foi capaz de inibir a formação de cristais de oxalato de cálcio em amostras de urina de humanos saudáveis. O efeito observado foi dose-dependente tendo sido avaliadas as concentrações de 0,05, 0,50 e 5,0 mg/mL. A caracterização química da fração por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas (CLUE-EM) mostrou a presença majoritária de saponinas esteroidais e flavonoides, destacando-se a presença majoritária de flavonas C-glicosiladas da apigenina, dentre as quais foi possível identificar a vicenina-2, além do flavonol rutina (**Quadro 2**) (MORENO *et al.*, 2021).

Em relação a *Costus arabicus*, estudos fitoquímicos também destacam a presença de flavonoides na espécie. As investigações farmacológicas concentram-se na demonstração da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos dos caules e folhas da espécie, apresentando

efeito contra um amplo espectro de bactérias e para fungos do gênero *Candida* ssp. (CUNHA *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Investigou-se também o uso etnofarmacológico de *Costus arabicus* para o tratamento de cálculos renais *in vitro*. Extrato aquoso da planta inteira inibiu o crescimento de cristais de oxalato de cálcio (CaOX) em sistema de cristais de CaOX monohidratados de forma dependente da concentração nas doses de 1,0, 10,0, 100,0 e 1000,0 µg/mL. O extrato também impediu a adesão de cristais de CaOX em células de rim canino MDCK-I, após pré-tratamento dos cristais com o extrato. É interessante observar que frações obtidas a partir do extrato etanólico utilizando diferentes solventes (butanol, acetato de etila, hexano, diclorometano e água) não apresentaram os efeitos observados pelo extrato aquoso. Os autores sugerem que possivelmente polissacarídeos sejam responsáveis pela atividade observada (DE CÓGÁIN *et al.*, 2015).

Dois pedidos de patente requerem a propriedade intelectual sob preparações fitoterápicas contendo extrato de *Costus arabicus*, isolado ou em associação com a espécie *Arrabidaea chica* para uso no tratamento de cálculos renais, afecções urinárias, hipertensão arterial e diabetes. O pedido tem como base resultados obtidos pela administração das preparações em pacientes acometidos pelos quadros citados, apresentando resultados positivos, especialmente para nefrolitíase, confirmando os estudos pré-clínicos, embora o número de sujeitos incluídos no trabalho seja reduzido e os documentos não forneçam detalhes sobre a condução dos ensaios clínicos (UCHÖA; CARVALHO, 2016, 2018).

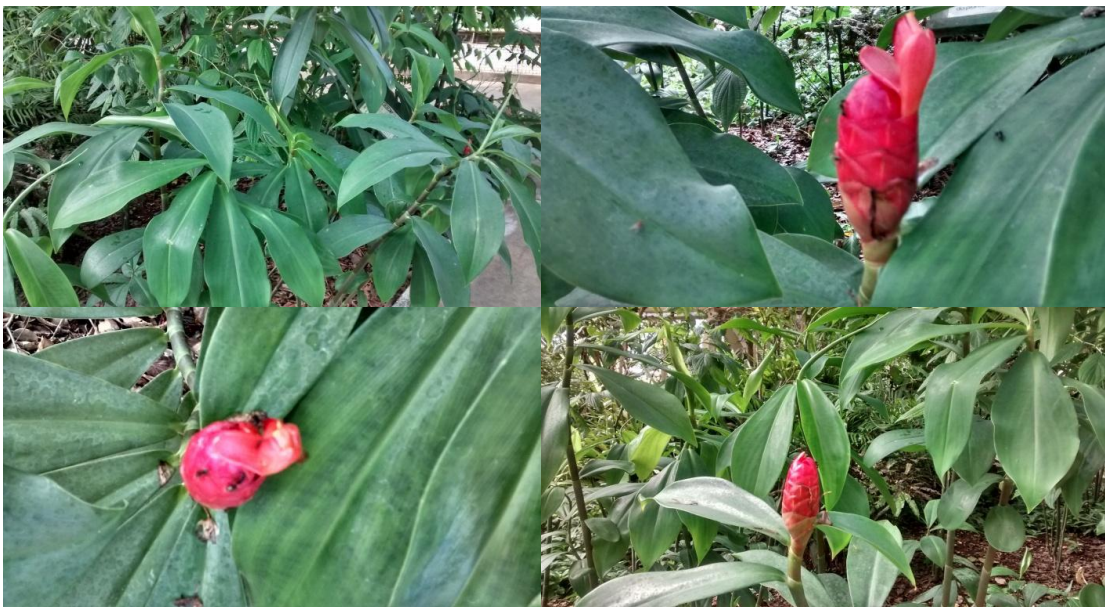
2.1.1.1 A espécie *Costus spiralis*

Costus spiralis (Jacq.) Roscoe (Costaceae), conhecida principalmente pelo nome popular Cana do Brejo, é uma das principais espécies de *Costus* utilizadas medicinalmente no Brasil, existindo relatos de ocorrência em todo o território nacional (ANDRÉ, 2022). Chás da espécie são indicados, na medicina popular brasileira, como diurético, depurativo e para tratamento de doenças do trato urinário (CORREA, 1984). A infusão dos caules é usada contra hepatite e dores de barriga (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Existem ainda relatos de que *Costus spiralis* seja utilizada popularmente como antimicrobiano, principalmente em infecções dos

tratos genital e urinário, e para tratamento de hipertensão, taquicardia e aterosclerose (BENKO-ISEPPON; CROVELLA, 2010; CORREA, 1984; CRUZ, 1982; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A espécie pode alcançar de 50 cm a 2 m de altura. Suas hastes são longas e as folhas espiraladas em relação ao ramo, espessas, elípticas, podendo chegar a até 35 cm de comprimento. Apresenta inflorescências racemosas em forma de espiga, possui brácteas vermelhas fechadas e sobrepostas, dentro das quais se desenvolve os botões florais e frutos. As inflorescências são vistosas e apresentam em média 9 cm de comprimento, sendo que cada uma pode conter, aproximadamente, de 30 a 50 flores. A maturação de flores e frutos ocorre em espiral de baixo para cima. As flores são vermelhas, róseas ou brancas, sendo o tubo floral formado por três pétalas fundidas na base com estame (DE ARAÚJO; OLIVEIRA, 2007; LORENZI; MATOS, 2021). A **Figura 3** apresenta imagens do exemplar vegetal coletado de *C. spiralis* para a realização deste estudo.

Figura 3 – Imagens de exemplares de *Costus spiralis* coletadas no Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica



Fonte: Fotografias da autora (2022).

Assim como relatado para as demais espécies de *Costus*, o número de trabalhos científicos conduzidos com *Costus spiralis* ainda é limitado. Os estudos referem-se principalmente ao

potencial de folhas da espécie para tratamento de doenças renais, inflamação e diabetes e demonstram a presença de flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos e esteroides (DUARTE; ANDRADE; OLIVEIRA, 2017).

Dentre as substâncias já isoladas para a espécie, citam-se a obtenção de duas saponinas esteroidais obtidas a partir de extrato hidrometanólico 80% dos rizomas da espécie. As substâncias isoladas demonstraram potencial atividade anti-inflamatória, por meio da inibição da permeabilidade capilar induzida pela administração de ácido acético em ratos (**Quadro 2**) (DA SILVA; PARENTE, 2004). Destaca-se que as saponinas são heterosídeos da diosgenina, utilizada como precursora na síntese de hormônios esteroidais (DA SILVA; PARENTE, 2004; DUARTE; ANDRADE; OLIVEIRA, 2017).

Porém a classe de metabólitos com maior número de substâncias isoladas da espécie são os flavonoides. A partir de extrato metanólico das folhas, isolou-se os flavonóis 3,5-diidroxí-7,4'-dimetoxiflavona-3-*O*-neohesperidosídeo e canferol-3-*O*-neohesperidosídeo assim como os heterosídeos tamarixetina-3-*O*-neohesperidosídeo, canferídeo-3-*O*-neohesperidosídeo e quercetina-3-*O*-neohesperidosídeo já relatados para *Costus spicatus* (**Quadro 2**) (ANTUNES; DA SILVA; PARENTE, 2000).

O flavonoide guajaverina foi isolado de extrato metanólico de *C. spiralis* e demonstrou atividade em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina em ratos. O pó das folhas, o extrato metanólico e a guajaverina mostraram-se capazes de melhorar a tolerância à glicose e inibir a peroxidação lipídica no fígado após administração oral (**Quadro 2**) (DUARTE *et al.*, 2018).

De Oliveira e colaboradores (2018) identificaram os isômeros escafósídeo e isoescafósídeo em fração obtida por partição utilizando acetato de etila e água, a partir de um extrato metanólico das folhas de *Costus spiralis*. A fração e as substâncias isoladas mostraram-se capazes de inibir a enzima α -gliconidase com IC₅₀ de aproximadamente 400 mg/mL e 900 mg/mL respectivamente (**Quadro 2**). Segundo os autores, a espécie pode ser uma nova fonte para a descoberta de substâncias anti-hiperglicêmicas naturais, corroborando com os resultados de

Duarte e colaboradores (2018). Destaca-se que a fração em acetato de etila foi mais ativa que as flavonas isoladas e que a arcabose ($IC_{50} = 798,70$ mg/mL), antidiabético utilizado como controle positivo, sugerindo que outras substâncias estão relacionadas ao efeito observado e que este pode ser considerado relevante (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A flavona C-glicosilada escafosídeo já havia sido isolada de extrato etanólico das folhas de *Costus spiralis* anteriormente pelo grupo de pesquisa da Professora Rachel Oliveira Castilho em trabalho conduzido por Garcia em 2011. Mais recentemente, outro estudo do mesmo grupo confirmou sua presença em extrato hidroetanólico e aquoso das folhas da espécie, assim como da flavona vicenina-2, identificada pela primeira vez na espécie e também relatada na espécie *Costus spicatus* (**Quadro 2**) (AMORIM *et al.*, 2022).

Em relação aos efeitos de *C. spiralis* na inflamação e sistema urinário, que se relacionam mais intimamente ao presente estudo, uma das primeiras pesquisas realizadas com a espécie avaliou a atividade do extrato aquoso da planta inteira, em urolitíase induzida pelo implante de cristais de oxalato de cálcio em discos de zinco na bexiga de ratos. O implante desses corpos estranhos induz a formação de pedras renais e a hipertrofia da musculatura lisa. Os resultados mostraram que o extrato nas concentrações de 0,25 e 0,5 g/kg administrado por via oral, não promoveu aumento da diurese e não evitou a hipertrofia da musculatura do órgão. Porém, observou-se redução significativa dos cálculos renais presentes nos animais tratados com o extrato em comparação ao grupo controle (ARAÚJO VIEL *et al.*, 1999).

Outro estudo demonstrou que o extrato aquoso de *Costus spiralis* reduziu a formação de cristais de oxalato de cálcio e sua interação com o epitélio renal. Para tanto, utilizou-se sistema de cristalização de oxalato de cálcio para investigar o efeito da espécie no crescimento dos cristais em células Madin Darby provenientes de rim canino. Em ensaio de proliferação celular de tetrazólio o extrato não apresentou citotoxicidade em concentrações de até 1000 mg/mL (DE CÓGÁIN *et al.*, 2011).

Mais recentemente, estudo conduzido por De Farias Silva e colaboradores (2021) investigou de forma mais detalhada a atividade anti-inflamatória de extrato seco metanólico obtidos das

folhas de *Costus spiralis* em diferentes modelos experimentais. O extrato foi fracionado utilizando sílica gel e os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol. As frações resultantes foram avaliadas na dose de 100 mg/kg por via oral nos modelos *in vivo* de contração abdominal induzida por ácido acético, nocicepção pela administração de formalina, placa quente, peritonite induzida por zymosan e um modelo experimental de artrite. Todas as frações foram capazes de inibir significativamente a contração abdominal assim como a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite. Destaca-se que o único grupo de metabólitos comum a todas as frações foram os esteroides. No teste de placa quente e no modelo de nocicepção por formalina na fase neurogênica não foi observado efeito dos derivados de *Costus spiralis*, porém, na fase inflamatória do segundo modelo, as frações obtidas com acetato de etila e etanol mostraram-se ativas. Por fim, no ensaio de inflamação crônica pela indução de artrite, apenas a fração clorofórmica foi capaz de reduzir o edema da pata (DE FARIAS SILVA *et al.*, 2021).

Os resultados descritos são coerentes com os obtidos pelo grupo de pesquisa, em que foi desenvolvido esta tese e que estuda a espécie desde 2009. Um histórico dos trabalhos publicados pelo grupo até 2022 estão resumidos no **Quadro 3**. No primeiro estudo realizado, extrato etanólico das folhas secas de *C. spiralis* apresentou atividade antiedematogênica por via oral em modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos Swiss. Prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e reagentes seletivos demonstrou a presença de flavonoides, saponinas, triterpenos e esteroides no extrato (GARCIA, 2011). Por meio de um fracionamento biomonitorado, verificou-se que duas frações derivadas desse extrato foram ativas após administração oral. A fração eluída com acetato de etila:metanol 30:50, rica em flavonoides, mostrou-se ativa assim como a fração hexânica, constituída principalmente de ácidos graxos, terpenos e esteroides. Conclui-se que os resultados poderiam sugerir que as classes de substâncias citadas teriam relação com a atividade demonstrada. A flavona escafósídeo isolada da primeira fração, também apresentou potencial atividade anti-inflamatória no mesmo modelo (**Quadros 2 e 3**) (GARCIA, 2011). Considerando esses resultados, prosseguiu-se como estudo da espécie objetivando-se a obtenção de um extrato com maior concentração de flavonoides e a avaliação em modelos experimentais relacionados ao uso etnofarmacológico para doenças renais.

Quadro 3 – Histórico dos projetos de pesquisa com a espécie *Costus spiralis* coordenados pela Profa. Rachel Oliveira Castilho

Período	Principais resultados	Referência
2009 - 2011	Extrato etanólico seco das folhas de <i>C. spiralis</i> (EECS) foi submetido a fracionamento biomonitorado. O extrato (500 e 1000 mg/kg) e as frações eluídas com acetato de etila:metanol (EtOAc:MeOH) (5,0, 50 e 500 mg/kg) e hexano (500 mg/kg) foram ativas em modelo de edema de pata induzida por carragenina por via oral. A partir da fração EtOAc:MeOH isolou-se a flavona escafosídeo que também foi ativa no modelo nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg. Método analítico por espectrofotometria foi desenvolvido e validado para determinação do teor de flavonoides totais expressos como quercetina no extrato e na fração EtOAc:MeOH, resultando em um teor de 0,795% e 0,918%, respectivamente.	Garcia (2011)
2011 - 2013	A fração hexânica obtida por Garcia (2011) foi analisada por cromatografia gasosa e por Cromatografia em Camada Delgada (CDD). Observou-se a presença de triterpenos, esteroides e ácidos graxos. O ácido ursólico foi identificado por CCD. EECS e as frações hexânica e EtOAc:MeOH foram avaliados em relação a atividade antioxidante pelo método do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, resultando em valores de IC ₅₀ de 171,1 µg/mL, 167,7 µg/mL e 231,8 µg/mL, respectivamente.	Amorim (2013)
2015 - 2017	Extrato hidroetanólico 80% das folhas <i>C. spiralis</i> (EHE80%) foi obtido por maceração com auxílio de ultrassom e mostrou-se capaz de recuperar a função renal dos ratos em modelo experimental de nefrotoxicidade induzida por cisplatina <i>in vivo</i> nas doses de 5, 15 e 30 mg/kg. O extrato inibiu de forma dependente da dose a expressão de Fator de Necrose Tumoral (TNF) em cultura de células THP-1 estimuladas por lipopolissacarídeo (10, 30 e 90 µg/mL). EHE80% apresentou IC ₅₀ de 100 e 150 µg/mL em avaliação de citotoxicidade em células e hepáticas (HepG2) e renais (Hek), respectivamente. Os flavonoides vicenina-2 e escafosídeo foram identificados no extrato por Cromatografia Líquida de Ultra Eficácia - espectrofotometria de massas (CLUE-EM). Métodos analíticos por CLUE-UV foram desenvolvidos e validados para quantificação de flavonas C-glicosiladas nas folhas secas de <i>C. spiralis</i> e EHE80%. A droga vegetal apresentou teores de 0,055% e 0,076% de vicenina-2 e escafosídeo, respectivamente. EHE80% apresentou um teor de flavonas C-glicosiladas totais de 2,512%, sendo 0,417% de vicenina-2 e 0,560% de escafosídeo.	Amorim (2017)

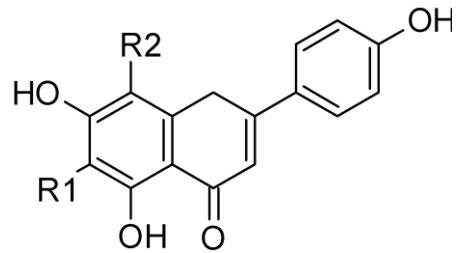
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Estudo posterior demonstrou o efeito nefroprotetor de extrato hidroetanólico 80% de folhas da espécie em modelo experimental de nefrotoxicidade induzida por cisplatina *in vivo* nas doses de 5, 15 e 30 mg/kg. O mesmo extrato foi capaz de inibir a produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) em células THP-1 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) de forma dose-dependente nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL. Os resultados permitiram sugerir que a atividade na recuperação da função renal estava relacionada a mecanismos anti-inflamatórios, sendo necessária investigação mais aprofundada para confirmação. Nesse trabalho, observou-se ainda a presença majoritária de flavonas C-glicosiladas da apigenina na espécie, sendo elas escafosídeo, identificado previamente por Garcia (2011) e vicenina-2, sendo o primeiro relato da presença dessa substância na espécie (**Quadros 2 e 3**). Além das duas flavonas, foi possível identificar mais quatro isômeros do escafosídeo, cujas estruturas ainda não foram determinadas

inequivocamente, mas, provavelmente, referem-se as estruturas apresentada na **Figura 4** (AMORIM, 2017; AMORIM *et al.*, 2022; CASTILHO *et al.*, 2021).

Figura 4 – Possíveis estruturas para flavonas C-glicosiladas presentes em folhas de *Costus spiralis*

	R ₁	R ₂
Neoescafosídeo	β-glicosil	β-arabinosil
Isoescafosídeo	α-arabinosil	β-glicosil
Neoisoescafosídeo	β-arabinosil	β-glicosil
Vicenin I	β-glicosil	β-xilosil
Vicenin III	β-xilosil	β-glicosil
Corimboside	α-arabinosil	β-galactosil
Isocorimboside	β-galactosil	α-arabinosil
Neocorimboside	β -arabinosil	β-galactosil



Fonte: Amorim *et al.* (2022)

Nesse mesmo trabalho, um método analítico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) foi desenvolvido e validado para quantificação de escafosídeo e vicenina-2 nas folhas secas da espécie e no extrato hidroetanólico. Os teores de vicenina-2 e escafosídeo foram 0,055% e 0,076%, para a droga vegetal, e 0,417% e 0,560%, para o derivado vegetal, respectivamente. Determinou-se ainda o teor de flavonas C-glicosiladas totais calculadas como escafosídeo no extrato, encontrando-se o valor de 2,449% (**Quadro 3**). Análise do mesmo extrato para determinação de flavonoides totais calculados como quercetina por espectrofotometria resultou em um valor de 0,880%. A variação pode ser explicada pela diferença de sensibilidade entre as técnicas e as especificidades de cada método. Este foi um dos primeiros e poucos relatos de determinação quantitativa de potenciais marcadores nas espécies de *Costus* utilizadas no Brasil e abre possibilidades para estabelecer o controle de qualidade da droga e derivados vegetais de *Costus spiralis* e demais espécies do gênero (AMORIM, 2017; CASTILHO *et al.*, 2021).

Outro estudo que descreve a determinação quantitativa de substâncias presentes na espécie foi conduzido por Souza e colaboradores (2018). Os autores encontraram 1,23% e 0,71% de fenóis

totais no extrato aquoso de folhas e caules das espécies, um valor coerente com o resultado obtido anteriormente pela mesma técnica, assumindo-se que os flavonoides parecem ser as substâncias fenólicas majoritárias na espécie (AMORIM *et al.*, 2022; DE SOUSA *et al.*, 2018). O conteúdo de fenólicos totais obtido por Souza e colaboradores (2018) refletiu em atividade antioxidante no método de DPPH com IC₅₀ de 11,82 mg/mL para extrato das folhas e 15,38 mg/mL para extrato dos caules. Substâncias fenólicas identificadas nos extratos incluíram flavonoides e taninos. A presença de saponinas também foi demonstrada. Os autores investigaram ainda o potencial citotóxico antígeno-tóxico dos extratos, usando o modelo de *Allium cepa*. Tanto as folhas quanto os caules apresentaram citotoxicidade nas doses de 4,5 mg/mL, 9,0 mg/mL, 18 mg/mL ao mesmo tempo em que foi observada atividade antígeno-tóxica. Baseado nos resultados obtidos, os autores demonstraram preocupação em relação ao uso popular da espécie (DE SOUSA *et al.*, 2018).

De fato, é importante a investigação da segurança do uso medicinal de *Costus spiralis*, assim como o aprofundamento da discussão sobre a caracterização química e controle de qualidade da espécie e sua potencial utilização no tratamento de doenças renais, os quais são objetivos desta tese.

2.2 A Doença Renal Crônica

A doença renal crônica (DRC) é uma doença extremamente complexa, sendo influenciada por diversos fatores e responsável por disfunções diversas nos demais sistemas do corpo humano. É uma doença altamente prevalente. Considerada um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo devido a sua elevada frequência, mortalidade e morbidade associada a custos elevados, complicações em decorrência de internações e necessidade de Terapia Renal Substitutiva (TRS) (AIRG-E *et al.*, 2022; BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; KALANTAR-ZADEH *et al.*, 2021; ZAMBELLI; GONÇALVES; ALVES, 2021).

Estima-se que em 2017 o número de pessoas em todo o mundo com doenças renais graves, ou seja, diagnosticadas com DRC ou IRA e/ou que estão em TRS ultrapassava 850 milhões, dentre as quais cerca de 97% apresentavam DRC. Para fazer uma comparação, esse número equivale

aproximadamente ao dobro de pessoas com diabetes e 20 vezes o número de pacientes que convivem com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) nos últimos anos (JAGER *et al.*, 2019). Esses valores, significam que em 2017, a prevalência global de DRC foi superior a 9%, tendo aumentado 29,3% desde 1990. No mesmo ano, 1,2 milhão de pessoas morreram em decorrência da doença, um aumento de 41,5% entre 1990 e 2017, tornando a DRC uma das principais causas de morte em todo o mundo (BIKBOV *et al.*, 2020; KOVESDY, 2022).

Os motivos para este aumento da prevalência da doença nas últimas décadas são difíceis de determinar e acredita-se que o crescimento esteja relacionado a uma soma de fatores. Alguns deles seriam o aumento da expectativa de vida em geral e dos pacientes com DRC, devido a um diagnóstico mais efetivo e/ou precoce. Alterações na incidência da doença também parecem ter impactado nos dados de prevalência, porém informações sobre a incidência da DRC são escassas e variáveis, considerando que sofrem grande influência da localização geográfica, idade, sexo e raça dos pacientes (KOVESDY, 2022). Em relação a mortalidade, a tendência também é de crescimento. Projeta-se para 2040 um número de 2 milhões de mortes no melhor cenário, chegando a 4,0 milhões no pior (FOREMAN *et al.*, 2018).

No Brasil, um inquérito epidemiológico de base domiciliar realizado em 2013 estimou uma prevalência de 1,42% de DRC no país (DE AGUIAR *et al.*, 2020). Dados mais recentes, obtidos pelo Censo Brasileiro de Diálise, estimam que o número total de pacientes em diálise crônica em 2020 foi de 144.779 pacientes, com taxas de prevalência e incidência de 648 e 209 pacientes por milhão da população, respectivamente. Desde 2001, o número de pacientes em diálise tem crescido gradativamente, resultando em um aumento de aproximadamente 300% nesse período. Segundo os autores, essa tendência de crescimento pode ser explicada pela maior longevidade da população e melhoria no atendimento e acesso dos pacientes com DRC à diálise. Observou-se ainda um aumento da taxa bruta de mortalidade de 18,2% em 2019 para 24,5% em 2020, o que pode ser atribuído à pandemia da doença do coronavírus de 2019 (COVID-19). Estima-se que 4,2% das mortes em 2020 tiveram como causa a COVID-19 (NERBASS *et al.*, 2021).

Uma maior compreensão dos dados de prevalência e mortalidade reportados nas últimas décadas têm sido possível devido à definição clara de critérios de diagnóstico e classificação da

DRC adotados por vários órgãos profissionais em todo o mundo. Atualmente, a DRC é conceitualmente caracterizada pela perda progressiva da função renal em decorrência de diferentes causas e mecanismos de agressão aos componentes do parênquima renal. É uma doença lenta e gradual, entretanto os pacientes permanecem praticamente assintomáticos nos estágios iniciais (KDIGO, 2013; KOVESDY, 2022). De forma objetiva, segundo a diretriz *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) de 2013, a DRC é definida pela alteração estrutural ou funcional dos rins e do trato urinário, presente por um período superior a 3 meses. São critérios diagnósticos uma taxa de filtração glomerular (TFG) <60 ml/min/1,73/m² ou evidência de lesão renal, como albuminúria aumentada (≥ 30 mg/g), sedimento urinário anormal e alterações histológicas no tecido renal observados neste período (KDIGO, 2013).

As causas de DRC são diversas, podendo ser classificadas em doenças glomerulares, doenças túbulo-intersticiais, doenças vasculares e doenças císticas e congênitas (**Quadro 4**). A doença pode ser secundária a diferentes condições, incluindo diabetes mellitus, glomerulopatias, distúrbios genéticos, doenças cardiovasculares, uso de medicamentos, condições urológicas, infecções e IRA. Estudos epidemiológicos apontam que as principais doenças primárias que levam ao desenvolvimento de DRC em indivíduos adultos são diabetes, hipertensão e glomerulopatias. No Brasil, de forma coerente com dados globais, as duas principais causas de DRC em 2020 foram hipertensão e diabetes, correspondendo a 32% e 31% dos casos. Fatores de risco associados à doença incluem ainda idade avançada, ascendência africana, condição socioeconômica mais baixa e fatores genéticos (BIKBOV *et al.*, 2020; KDIGO, 2013; NERBASS *et al.*, 2021; NOBLE; TAAL, 2019).

Quadro 4 – Classificação da DRC por etiologia

	Exemplos de doenças sistêmicas que afetam os rins	Exemplos de doenças renais primárias
Doenças glomerulares	Diabetes, doença autoimunes, infecção sistêmicas, neoplasias	Glomerulonefrites, glomerulosclerose, nefropatia membranosa e de lesão mínima
Doenças túbulo-intersticiais	Infecções sistêmicas, autoimune, sarcoidoses, medicamentos, urato, neoplasias	Pedras, obstrução, Infecções do trato urinário
Doenças vasculares	Arteriosclerose, hipertensão arterial sistêmica (HAS), isquemia, vasculite sistêmica, esclerose sistêmica.	Vasculite renal limitada associada a anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), displasia fibromuscular
Doenças císticas e congênitas	Doenças renais policísticas, síndrome de Apport, doença de Fabry	Displasia renal, doenças císticas medular, podocitopatias.

Fonte: Adaptado de KDIGO (2013).

O tempo de progressão da DRC é variável e é influenciado por diferentes fatores, incluindo mecanismos imunológicos, inflamatórios e fibrogênicos complexos que resultam na perda da função dos rins, especialmente devido à redução do número de néfrons funcionantes. A condição pode progredir para doença renal em fase terminal, caracterizada por insuficiência renal, geralmente associada à alta mortalidade e morbidade cardiovascular, com a necessidade TSR (KALANTAR-ZADEH *et al.*, 2021; ROSENBERG, 2019).

Segundo protocolo do Ministério da Saúde para pacientes com DRC no SUS e as diretrizes mais atuais do KDIGO, a doença pode ser classificada em seis estágios de acordo com a taxa de filtração glomerular, conforme apresentado no **Quadro 5**. A diretriz do KDIGO também preconiza uma classificação baseada na albuminúria persistente em 3 estágios e descreve o risco atribuído a cada categoria (**Quadro 5**). A classificação norteia as tomadas de decisão para o cuidado clínico no controle dos fatores de progressão da DRC, que devem ser intensificados de acordo com a evolução da doença (BRASIL, 2014; KDIGO, 2013).

Quadro 5 – Classificação e prognóstico de DRC de acordo com a TFG e albuminúria

		Classificação por albuminúria persistente			
		Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	
		<30 mg/g	30-300 mg/g	>300mg/g	
Classificação por TFG (ml/min/1,73 m ²)	Estágio 1	≥90	Risco baixo	Risco moderado	Risco alto
	Estágio 2	60-89	Risco baixo	Risco moderado	Risco alto
	Estágio 3A	45-59	Risco moderado	Risco alto	Risco muito alto
	Estágio 3B	30-44	Risco alto	Risco muito alto	Risco muito alto
	Estágio 4	15-29	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto
	Estágio 5	<15	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto

Fonte: Adaptado de KDIGO (2013) e Brasil (2014).

Estudos têm demonstrado que o diagnóstico precoce da doença e o tratamento utilizando abordagens farmacológicas e não farmacológicas em seus estágios iniciais podem ser determinantes para retardar a progressão da doença para a fase terminal. Porém, os tratamentos disponíveis ainda são considerados limitados e existem poucos medicamentos específicos para o tratamento da doença. Nos últimos 20 anos, os únicos fármacos que mostraram uma redução no risco de progressão da DRC em pacientes renais crônicos foram inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA) (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; KALANTAR-ZADEH *et al.*, 2021; MENDE, 2022).

Segundo levantamento realizado por Newman e Cragg (2020), entre 1981 e 2019, dos 1881 medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), no máximo três medicamentos apresentaram como indicação oficial o tratamento de DRC, refletindo a deficiência de inovações farmacoterapêuticas na área. Embora não sejam citados nesse levantamento, os únicos fármacos inovadores aprovados nas últimas décadas para a doença são os inibidores do cotransportador de sódio-glicose 2 (SGLT2), como a dapaflozina, fármaco desenvolvido e aprovado inicialmente como antidiabético, que se mostrou eficaz na redução de complicações renais e cardiovasculares graves e mortalidade em pacientes renais crônicos, na presença ou não de diabetes (HEERSPINK *et al.*, 2020; MENDE, 2022; NEWMAN; CRAGG, 2020). Ainda assim, considerando os poucos avanços na farmacoterapia da doença, especialistas defendem a investigação de novas e múltiplas farmacoterapias para o manejo da

doença, devendo-se priorizar tratamentos preventivos e que atuem em sua fase inicial (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; KALANTAR-ZADEH *et al.*, 2021).

Neste contexto, também é importante destacar que a prevenção de DRC está intimamente relacionada ao tratamento de quadros de IRA, importante fator de risco para desenvolvimento DRC, mesmo para pacientes que apresentam boa recuperação do quadro agudo. Especialistas sugerem que as duas doenças estão estreitamente interligadas, não sendo condições completamente isoladas. Tanto a IRA é fator de risco para DRC, como o contrário também pode ser observado, ou seja, pacientes com DRC têm maiores chances de apresentarem episódios de IRA (CHAWLA *et al.*, 2014; CHAWLA; KIMMEL, 2012; LEAF; WAIKAR, 2017).

A IRA é caracterizada por um declínio acentuado da função renal em poucas horas ou dias e que, embora grave, é potencialmente reversível. Em geral, o diagnóstico leva em consideração o aumento agudo dos níveis séricos de creatinina e redução significativa do volume urinário (CHAWLA *et al.*, 2014; LEAF; WAIKAR, 2017). Segundo a última diretriz publicada pela KDIGO, em 2012, o diagnóstico deve ser realizado pela presença de pelo menos uma das seguintes condições: aumento do valor da creatinina sérica $\geq 0,3$ mg/dL em 48 horas ou em uma taxa $\geq 1,5x$ em relação ao valor basal, conhecido ou estimado, em 7 dias, ou ainda um volume urinário inferior a 0,5 mL/kg/h em 6 horas (KDIGO, 2012).

As causas da IRA são diversas, podendo estar relacionadas à diminuição da perfusão renal, como consequência de condições externas aos rins, a uma doença renal primária, à utilização de drogas nefrotóxicas ou à obstrução do trato urinário, como pode ocorrer em pacientes com cálculos renais. A administração de medicamentos nefrotóxicos, particularmente, tem causado preocupação, já que é uma das principais causas de IRA em pacientes considerados críticos. Esses pacientes têm apresentado risco aumentado para desenvolvimento da doença nas últimas décadas associado ao fato de utilizarem múltiplas drogas, muitas delas tóxicas ao sistema renal (JOYCE *et al.*, 2017; KANE-GILL; GOLDSTEIN, 2015; SALES; FORESTO, 2020).

De fato, estudos que investigaram a incidência na população em geral, e, sobretudo, em pacientes criticamente enfermos ou em condições de internação, têm sugerido aumento dos casos nos últimos anos, além de forte associação da condição à alta taxa de mortalidade. Os dados relatados na literatura variam consideravelmente, em decorrência do cenário (IRA adquirida na comunidade ou em ambiente hospitalar), da população estudada além dos diferentes critérios diagnósticos empregados (JOYCE *et al.*, 2017; LEAF; WAIKAR, 2017; SIEW; DAVENPORT, 2015). Revisão realizada por Lewington, Cerdá e Mehta (2013) verificou que a IRA afeta entre 7 e 18% de pacientes internados, chegando a valores entre 30 e 70% em pacientes mais graves. A frequência de IRA variou de 20 a 200 por milhões de habitantes, considerando a população não hospitalar. Dados de mortalidade, em geral, são superiores a 10%, podendo chegar a 60% em pacientes críticos (ALI *et al.*, 2007; LEWINGTON; CERDÁ; MEHTA, 2013; SANCHEZ-PINTO *et al.*, 2015).

A dificuldade de padronização dos critérios diagnósticos e a ausência de marcadores suficientemente sensíveis e diretos dificulta a intervenção clínica precoce para tratamento da IRA, o que somado a ausência de tratamentos específicos e efetivos, resultam em uma significativa ocorrência de desfechos desfavoráveis para a doença, incluindo a alta mortalidade e o desenvolvimento da DRC (FORNI; CHAWLA; RONCO, 2017; LEAF; WAIKAR, 2017).

Neste contexto, muitos modelos experimentais *in vivo* têm sido utilizados para avaliação de agentes terapêuticos com potencial para o tratamento de IRA e DRC. Os modelos animais são importantes para a compreensão das características das doenças renais e o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes. Um número significativo de modelos conhecidos é baseado na administração de substâncias nefrotóxicas, sendo que grande parte destas desencadeiam um quadro de IRA com necrose tubular aguda como, por exemplo, os fármacos cisplatina e gentamicina (SINGH *et al.*, 2012). Por outro lado, um modelo experimental de DRC que se tem mostrado interessante consiste na indução de nefrotoxicidade pela administração de doxorubicina. O fármaco induz efeitos agudos leves, mas principalmente efeitos crônicos significativos com características semelhantes aos da síndrome nefrótica (SN) em humanos, uma doença renal glomerular que será discutida com mais detalhes a seguir (PEREIRA *et al.*, 2015).

2.2.1 A síndrome nefrótica e o modelo experimental de nefropatia induzida doxorubicina

A SN é uma doença renal que acomete parcela significativa da população pediátrica e adulta, caracterizada por proteinúria importante ($> 3,0-3,5 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{dia}$ em adultos e $\geq 40 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{h}$ em crianças), hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia. Outras manifestações incluem eventos tromboembólicos, hipertensão arterial sistêmica e infecções de repetição, além de IRA, nos estágios iniciais, e evolução para DRC em fase terminal na etapa crônica da doença, com necessidade de TSR (BRASIL, 2021; KDIGO, 2021).

As doenças glomerulares, como a SN, são responsáveis por 20 a 25% dos casos de DRC em estágio final registrados mundialmente. A prevalência varia consideravelmente de acordo com a população estudada, mas é possível afirmar que a SN é a glomerulopatia mais comum em crianças e adultos, sendo uma das principais causas de lesão renal irreversível na população mais jovem (BRASIL, 2021; KDIGO, 2021; SALEEM; BIERZYNSKA, 2017). No Brasil, dados epidemiológicos relacionados a doenças glomerulares são escassos, porém um levantamento feito entre 1993 e 2007, que analisou por biópsia rins de pacientes das cinco regiões do país, concluiu que as doenças glomerulares foram as mais frequentes, atingindo quase 80% dos diagnósticos realizados (BRASIL, 2021; POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010).

Basicamente, a SN é causada por alterações na permeabilidade e/ou seletividade da barreira de filtração glomerular, sendo que o comprometimento ou a perda da função dos podócitos tem um papel central nesse processo. Essas alterações podem estar associadas à lesão renal primária, e, nesses casos, a doença é classificada como síndrome nefrótica idiopática (SNI) ou primária, sendo muito comum na população pediátrica. A patogênese da doença ainda não está elucidada, mas acredita-se que a SNI pode ser desencadeada por alterações genéticas na expressão de proteínas estruturais dos podócitos, por uma resposta anormal do sistema imunológico, especialmente por células T, ou por fatores circulantes que afetam a permeabilidade glomerular. A outra possibilidade é que as lesões sejam causadas por doenças sistêmicas que afetam os rins como doenças metabólicas e autoimunes, infecções e síndromes genéticas. Nestes casos, a doença é denominada SN secundária (SALEEM; BIERZYNSKA, 2017; SINHA; BAGGA, 2012).

A SN, primária ou secundária, pode ser classificada de acordo com o padrão de lesão renal. A forma mais comum, especialmente na SNI pediátrica, é a síndrome nefrótica por lesões mínimas (SNLM). Nesses casos, a microscopia convencional dos rins, em geral, mostra-se normal, não sendo observados sinais de infiltração imunológica ou aumento de marcadores inflamatórios. As lesões são observadas apenas por microscopia eletrônica, com alterações na estrutura dos podócitos. A doença também pode-se apresentar como glomerulosclerose segmentar e focal (GESF), em que se observa fibrose glomerular crônica ou ainda, como nefropatia membranosa (NM), condição associada ao depósito de imunocomplexos entre os podócitos e a membrana basal glomerular (EDDY; SYMONS, 2003; SALEEM; BIERZYNSKA, 2017).

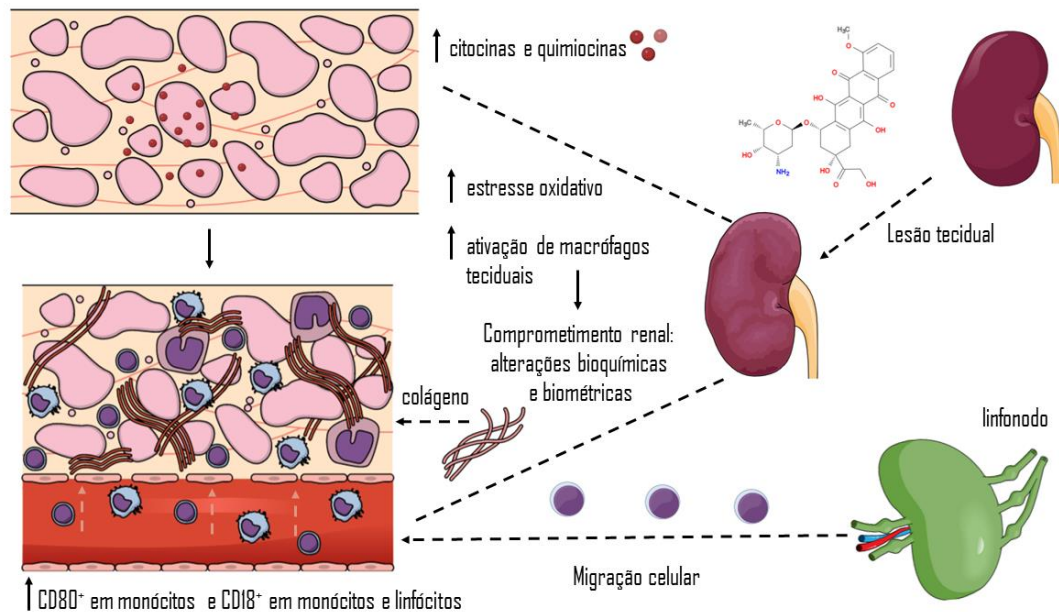
O tratamento da SN é amplo e depende da forma em que a doença se apresenta, incluindo medidas farmacológicas e não farmacológicas, visando à regulação do sistema imune, tratamento do edema nefrótico, o controle da proteinúria, pressão arterial e dislipidemia, além da prevenção de infecções e fenômenos tromboembólicos. No geral, o tratamento de primeira linha para SNI compreende o uso de corticoides, sendo que uma das formas de classificação da doença é baseada na resposta à terapia com esses fármacos, dividindo os pacientes em corticossensíveis ou corticoresistentes. O uso de IECA, por exemplo o enalapril e o captopril, e de BRA, como a losartana, é comum em paciente com SN para controle da pressão da arterial e redução da proteinúria (BRASIL, 2021; SINHA; BAGGA, 2012)

Assim como discutido para a DRC e IRA, de uma maneira geral, pesquisadores reforçam a necessidade de investigar novas alternativas para o tratamento específico da SN (NOONE; IJIMA; PAREKH, 2018; SINHA; BAGGA, 2012). Embora ainda existam muitas perguntas sem resposta, é possível observar avanços na compreensão da fisiopatologia da doença, que ocorre por meio de processos multifatoriais, envolvendo mecanismos inflamatórios, a perturbação do metabolismo lipídico e a participação dos sistemas imunológico e renina angiotensina. No entanto, esses avanços não têm refletido no desenvolvimento de novas opções terapêuticas (AHMADIAN *et al.*, 2022; DE FÁTIMA PEREIRA *et al.*, 2014; NOONE; IJIMA; PAREKH, 2018; PEREIRA *et al.*, 2015; SILVA FILHA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, novos estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. A administração intravenosa de doxorrubicina, dentre os diferentes modelos experimentais propostos na literatura para a indução de nefrotoxicidade, tem sido considerada útil para investigação dos mecanismos da DRC e especificamente, da síndrome nefrótica, como também para descoberta de potenciais alternativas farmacológicas. Em roedores, esse fármaco induz lesões renais semelhantes às observadas em pacientes com SN o que, aliado ao baixo custo relativo do fármaco, manejo simples e boa reprodutibilidade têm contribuído para a frequente utilização desse modelo no meio científico. Esses fatores embasaram sua escolha para avaliação preliminar da aplicação de *Costus spiralis* no tratamento de DRC nesta tese, a fim de se obter mais dados sobre a potencialidade terapêutica da espécie e esclarecimentos sobre possíveis mecanismos de ação (PEREIRA *et al.*, 2015; PIPPIN *et al.*, 2009).

Nesse modelo, os mecanismos de lesão renal incluem a participação do sistema imune e da resposta inflamatória, com aumento do estresse oxidativo local e a ativação de macrófagos teciduais. A ativação dos macrófagos libera citocinas e quimiocinas inflamatórias, que ativam e recrutam monócitos e linfócitos, induzindo o acúmulo de colágeno e agravando a lesão renal (**Figura 5**). Como resultados, observam-se alterações bioquímicas e biométricas, com proteinúria intensa, edema e fibrose renal. Dessa forma, uma vez que mecanismos imuno-inflamatórios contribuem para o quadro induzido nesse modelo, os efeitos anti-inflamatórios previamente observados para extratos de *Costus spiralis* também justificam a sua utilização para avaliação do efeito da espécie em doenças renais (PEREIRA *et al.*, 2015).

Figura 5 – Proposta de patogênese de lesão renal na nefropatia induzida pela doxorubicina



Fonte: Adaptado de Pereira *et al.* (2015).

Nota: No modelo de nefropatia induzida por doxorubicina, o fármaco induz uma lesão no tecido renal, com ativação dos macrófagos teciduais e aumento do estresse oxidativo, os quais levam ao comprometimento renal com alterações bioquímicas e biométricas. Os macrófagos ativados liberam citocinas e quimiocinas, que ativam e recrutam novas células de defesa, especialmente monócitos e linfócitos de gânglios linfáticos. Essas células se acumulam nos rins, induzindo o acúmulo de colágeno e, conseqüentemente, o agravamento do dano renal.

2.3 Plantas medicinais no tratamento da Doença Renal Crônica

Apesar da alta prevalência e gravidade das doenças renais, conforme já discutido, poucos avanços foram realizados nos últimos anos em relação ao desenvolvimento de novos medicamentos. O número de investigações pré-clínicas e clínicas na área de nefrologia é baixo quando comparado com demais áreas da medicina, sendo ainda mais discrepante a comparação do registro de novos medicamentos para doenças renais nos últimos 30 anos em relação às outras indicações terapêuticas (CHATZIMANOUIL; WILKENS; ANDERS, 2019; NEWMAN; CRAGG, 2020; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2020).

Uma alternativa para a inovação na área é o estudo de plantas medicinais e seus derivados. Fitoterápicos apresentam, em geral, uma relação risco-benefício positiva, sendo bem tolerados e seguros em comparação aos medicamentos convencionais. Ao mesmo tempo podem

apresentar bons resultados de efetividade especialmente em quadros leves a moderados de doenças agudas ou crônicas. Além disso, são produtos amplamente acessíveis e bem aceitos pela população (KLEIN *et al.*, 2009; MIRALDI; BAINI, 2019)

Tratando-se especificamente da DRC, esses produtos constituem alternativas promissoras, especialmente para prevenção ou tratamento de estágios iniciais. A complexidade dessa doença exige uma abordagem multifatorial, conforme já discutido, e, neste sentido, esses produtos são particularmente promissores. Os fitoterápicos apresentam em sua constituição um conjunto de substâncias ativas, denominado fitocomplexo, que podem agir de forma sinérgica em diferentes vias e alvos terapêuticos, gerando, muitas vezes, desfechos clínicos melhores do que àqueles observados com a administração de substâncias isoladas, ainda que de forma simultânea (DE SOUSA *et al.*, 2018; MIRALDI; BAINI, 2019; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2020).

Estudos pré-clínicos e clínicos descreveram um número significativo de produtos naturais isolados e derivados vegetais com atividade nefroprotetora ou na recuperação da função renal. Várias classes de metabólitos secundários são citadas como agentes terapêuticos em potencial, destacando-se os polifenóis, alcaloides, terpenos, carotenoides e saponinas. Dentre eles, o maior número de trabalhos concentra-se na avaliação de polifenóis, principalmente flavonoides. Os mecanismos pelos quais esses metabólitos atuam incluem principalmente efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-fibróticos, sendo estes últimos considerados altamente promissores para o tratamento da DRC. Também são relatadas a capacidade de minimizar efeitos de agentes nefrotóxicos, redução da pressão arterial e atenuação da proteinúria e hematúria por mecanismos ainda não estabelecidos (AVILA-CARRASCO *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2021; JIVISHOV; NAHAR; SARKER, 2020; RAPA *et al.*, 2020).

Revisões sistemáticas de estudos clínicos randomizados que investigaram o efeito de plantas medicinais, sobretudo, preparações da Medicina Tradicional Chinesa, concluíram que diferentes fitoterápicos apresentam benefícios na nefropatia diabética, síndrome nefrótica e doença renal crônica (LIU *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Revisão sistemática com meta-análise encontrou seis plantas medicinais com resultados promissores para tratamento de DRC, sendo elas *Curcuma longa*, *Camellia sinensis*, *Rheum*

rhabarbarum, *Tripterygium wilfordii*, *Paeonia lactiflora* e *Salacia chinensis*, cujos efeitos parecem estar relacionados a presença de polifenóis e terpenoides (FREIRE, 2020). Porém, todos os autores ressaltam que os trabalhos incluídos são heterogêneos, apresentam qualidade baixa a moderada, sendo necessária a condução de mais estudos para avaliação do efeito desses produtos nas doenças renais (FREIRE, 2020; LIU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Dessa forma, considerando os relatos atualmente disponíveis na literatura científica, as plantas medicinais e seus derivados podem e devem ser mais bem explorados para o tratamento de doenças renais, sobretudo a DRC. A investigação do uso etnofarmacológico de plantas utilizadas tradicionalmente ou popularmente é uma alternativa promissora para descoberta de alternativas em potencial, como é o caso da espécie *Costus spiralis*, e deve ser associada à padronização adequada das preparações avaliadas e estudos mais robustos a fim de possibilitar sua incorporação na prática clínica (FREIRE, 2020).

2.4 Desenvolvimento e controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil

No Brasil, fitoterápicos são definidos como produtos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais, exceto substâncias isoladas, com a finalidade de prevenir ou tratar condições de saúde. As matérias primas vegetais podem constituir a planta medicinal fresca, a droga vegetal, ou seja, a planta inteira ou parte da planta medicinal após processo de estabilização e secagem, ou ainda derivados vegetais, conceituados como produtos obtidos a partir de processo de extração da planta medicinal ou droga vegetal. Em geral, fitoterápicos industrializados são produzidos a partir de drogas e derivados vegetais denominados pela ANVISA como Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais (IFAV) (ANVISA, 2014a).

Para fins de registro, a ANVISA exige que os fitoterápicos tenham qualidade, segurança, eficácia e/ou efetividade demonstradas. A eficácia/efetividade e a segurança desses produtos podem ser comprovadas por estudos clínicos, no caso de Medicamentos Fitoterápicos (MF) ou por dados publicados na literatura técnico-científica que demonstrem o uso tradicional seguro e efetivo por um período de pelo menos 30 anos, para Produtos Tradicionais Fitoterápicos

(PTF). Já o controle da qualidade deve ser realizado por meio da identificação e quantificação de marcadores, substâncias ou classes de substâncias presentes no fitoterápico que preferencialmente tenham relação com a atividade terapêutica. Todas essas definições e normas estão detalhadas em legislações publicadas nos últimos anos, que integram as ações do PNPMF (ANVISA, 2014a; BRASIL, 2016).

Embora o Brasil seja o país com uma das maiores biodiversidades do mundo, atualmente o país não pode ser considerado uma referência no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos inovadores (GUTIERREZ, 2022). Segundo levantamento realizado por Gutierrez (2022), em março de 2022, 342 fitoterápicos constavam no banco de dados da ANVISA, sendo 80% deles registrados ou notificados como MF ou PTF por meio de processos simplificados, ou seja, cujas espécies vegetais constam na Instrução Normativa nº 2/2014 ou em monografias estabelecidas pelo Conselho de Produtos Fitoterápicos da Agência de Medicamentos Europeia (ANVISA, 2014a; ANVISA, 2014b). Nesses casos, considera-se que dados de eficácia, efetividade e segurança já foram previamente determinados, não sendo necessária a condução de novos estudos. Destaca-se ainda que menos de 10% dos fitoterápicos registrados ou notificados no país são derivados de espécies nativas brasileiras. Esses dados mostram a necessidade de se devolver a cadeia produtiva de fitoterápicos no Brasil de forma inovadora, contribuindo para a obtenção de novos produtos que possam contemplar mais variedades de aplicações clínicas (GUTIERREZ, 2022).

Sabe-se que de maneira geral, este é um grande desafio. Do ponto de vista metodológico, pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos à base de produtos naturais são mais complexas do que estudos realizados com substâncias sintéticas, sendo que o desenvolvimento de fitoterápicos é particularmente desafiador. Algumas questões específicas em relação à pesquisa com esses produtos envolvem possíveis ambiguidades em relação a sua composição o que exige a necessidade da autenticação botânica completa desde o início e a caracterização adequada da droga ou derivado vegetal utilizado, além da obtenção de resultados farmacológicos de difícil interpretação, uma vez que algumas atividades podem estar relacionadas a uma ou mais classes de substâncias e não a uma única substância específica (HEINRICH *et al.*, 2020).

A natureza pode ser considerada a principal provedora de um medicamento fitoterápico e ela não produz intencionalmente metabólitos secundários para benefício humano. Dessa forma, o trabalho se inicia na seleção e identificação adequada do material botânico, sendo que para a obtenção de um produto comercialmente viável um estudo agrônomo será necessário, para definir a melhor forma de cultivo e a viabilidade de produção em escala (GUTIERREZ, 2022; HEINRICH *et al.*, 2020).

A composição química das matérias-primas vegetais varia em função das condições de cultivo, colheita/coleta, processamento e armazenagem dos insumos. A ausência de um controle adequado pode prejudicar a reprodutibilidade de investigações científicas, assim como compromete a produção industrial ou magistral de fitoterápicos. O processo de padronização até a obtenção de um fitocomplexo reprodutível pode levar anos, sendo necessário vários processos de coleta ou colheita (GUTIERREZ, 2022; OLIVEIRA; ROPKE, 2016).

Após essa etapa, é necessário desenvolver e validar o método de obtenção do derivado vegetal em bancada para os testes farmacológicos e toxicológicos preliminares que devem ser adequados ao estudo de matrizes complexas. Posteriormente, será necessário o desenvolvimento da formulação contendo o derivado vegetal que dê origem a uma forma farmacêutica tecnicamente estável e economicamente viável, para que então sejam conduzidos os estudos clínicos que possam avaliar a segurança e eficácia na aplicação desejada. Durante esse processo, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos suficientes para caracterização adequada dos insumos vegetais ativos e produtos de forma a garantir a qualidade desses produtos, bem como a reprodutibilidade do estudos pré-clínicos e clínicos realizados (BRAGA, 2021; GUTIERREZ, 2022; HEINRICH *et al.*, 2020).

Muitas vezes, a etapa de caracterização química não é considerada em processos de pesquisa para o desenvolvimento de fitoterápicos. O Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais (PPPM), um dos pioneiros na área no Brasil, que tinha o objetivo de investigar plantas brasileiras utilizadas medicinalmente, concentrou as investigações em ensaios pré-clínicos e na maioria dos casos sem estudos sobre a composição química e qualidade das drogas e derivados vegetais avaliados (BRAGA, 2021; BRASIL, 2006). Observa-se uma sobreposição da pesquisa

básica em relação à pesquisa aplicada, e os resultados acabam por não propulsionar de fato o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos inovadores, sendo a padronização do processo produtivo e o controle de qualidade um grande gargalo (GUTIERREZ, 2022).

A atualização da regulamentação nacional para registro de fitoterápicos está sendo discutida nos últimos anos com base, principalmente, no modelo europeu, para definição de critérios de qualidade e de produção com maior coerência técnica, que por consequência, impactam na maior segurança e eficácia desses produtos. Uma modificação importante seria a incorporação regulatória dos conceitos de “extratos padronizados”, “extratos quantificados” e “outros extratos”, os quais já foram incluídos na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019a). Nos primeiros, os derivados vegetais devem ser ajustados e ter sua qualidade controlada com base em um ou mais constituintes sabidamente responsáveis pela atividade terapêutica. O segundo tipo refere-se a extratos contendo um ou mais marcadores ativos, ou seja, substâncias ou classes de substâncias que têm relação com a atividade terapêutica, e que sua qualidade é dada pelo controle e ajustes de faixas determinadas de tais marcadores. Por fim, outros extratos são aqueles definidos essencialmente pela padronização do processo produtivo e o controle de qualidade por marcadores analíticos, cuja relação com a atividade terapêutica não existe ou não foi estabelecida (ANVISA, 2014a; ANVISA, 2019a; GUTIERREZ, 2022).

A revisão da regulamentação sanitária para o registro de fitoterápicos e o incentivo à pesquisa na área é uma necessidade do Brasil, que pode trazer benefícios importantes para os cuidados em saúde da população. Políticas públicas efetivas devem ser implementadas para o desenvolvimento do mercado nacional, educação da classe prescritora de forma a garantir o acesso e a qualidade desses produtos (GUTIERREZ, 2022). Neste contexto, trabalhos como o desenvolvido nesta tese devem ser incentivados a fim de possibilitar o desenvolvimento de produtos inovadores baseados em espécies nativas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente extratos de *Costus spiralis* ricos em flavonoides e realizar estudos pré-clínicos para avaliar sua segurança e eficácia em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina *in vivo*, a fim de determinar seu potencial no tratamento de DRC, os possíveis mecanismos envolvidos e as substâncias ativas presentes.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método extrativo otimizado para obtenção de extratos das folhas de *C. spiralis* ricos em flavonoides.
- Avaliar os extratos obtidos de acordo com o perfil cromatográfico e teor de flavonas C-glicosiladas totais e selecionar derivados vegetais para condução dos ensaios biológicos.
- Caracterizar quimicamente a droga vegetal e extratos selecionados por meio da determinação quantitativa e/ou qualitativa de classes de metabólitos já relatadas para a espécie.
- Desenvolver métodos analíticos e determinar parâmetros para controle de qualidade da droga e derivados vegetais obtidos.
- Caracterizar os extratos selecionados com base em ensaio químico de atividade antioxidante.
- Demonstrar o efeito dos extratos obtidos em parâmetros biométricos e bioquímicos relacionados à função renal no modelo experimental proposto, especialmente na redução da proteinúria.
- Determinar os efeitos do modelo experimental proposto e dos tratamentos avaliados em estudo de metabolômica plasmática.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos selecionados.
- Determinar a toxicidade aguda *in vivo* dos extratos selecionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo, coleta e identificação botânica dos materiais vegetais

As coletas das folhas de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe e de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. foram realizadas no Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, em Março de 2018 (19°51'26.4" S; 44°0'24.8" W). O material vegetal de *Costus spiralis* é cultivado na Estufa da Mata Atlântica da Fundação, sem incidência direta de luz, em solo próprio da região adubado exclusivamente com esterco bovino adquirido de diferentes fornecedores. A irrigação é realizada em dias alternados. Fotos da estufa e da amostra vegetal estão apresentadas na **Figura 6**.

Figura 6 – Fotos da estufa da Mata Atlântica da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte/Minas Gerais, onde o material vegetal de *Costus spiralis* foi coletado



Fonte: Fotografias da autora (2022).

Nota: Visão externa (A) e interna (B e C) da estufa da Mata Atlântica da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte/Minas Gerais. Nas fotos C e D, é possível visualizar a área onde está cultivado o material vegetal de *Costus spiralis*. Coleta e exemplares estão indicados por setas.

Já a espécie *Costus spiralis* é cultivada em local aberto, próximo a estufa da Mata Atlântica e os exemplares estão sujeitos à incidência de luz solar (**Figura 7**). As demais condições de cultivo são semelhantes às descritas para *Costus spiralis*.

Figura 7 – Fotos do material vegetal de *Costus spiralis* coletado na área externa do Jardim de Plantas Medicinais da Atlântica da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte/Minas Gerais



Fonte: Fotografia da autora (2022).

Os exemplares coletados foram previamente identificados e uma exsicata está depositada para cada espécie no Herbário da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte sob número CV JBFZB1874 para *Costus spiralis* e BHZB13164 para *Costus spicatus*. O acesso ao Patrimônio Genético (PG) foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com número de cadastro A27598E.

4.2 Preparo do material vegetal

Imediatamente após a coleta, as folhas *Costus spiralis* e *Costus spicatus* foram selecionadas, limpas e secas em estufa ventilada ($T \leq 40$ °C) por 10 dias. Posteriormente, o material foi pulverizado em moinho de facas. O pó resultante foi peneirado em tamis (Tyler 20) para padronização da sua granulometria em 840 μm .

4.3 Caracterização química da droga vegetal de *Costus spiralis*

4.3.1 Perda por dessecação

O pó das folhas foi submetido a ensaio de perda por dessecação conforme método geral preconizado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (ANVISA, 2019a). Para tanto, pesaram-se, com exatidão, cerca de 1,0 g da droga vegetal, em pesa filtro, previamente dessecado. O pesa filtro contendo a amostra foi colocado destampado em estufa à temperatura de 105 °C, sendo pesado periodicamente, até peso constante, constatado por duas pesagens consecutivas, com uma hora de intervalo, com variação $\leq 0,50$ mg. O tempo total de secagem foi de 5 horas, sendo a primeira pesagem realizada após 3 horas, e então duas pesagens com intervalo de 1 hora. O resultado foi expresso em massa de voláteis a 105 °C (g) para 100 g de droga vegetal (% p/p).

4.3.2 Determinação do índice de espuma

Determinou-se o índice de espuma conforme método geral descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (ANVISA, 2019a). O procedimento consistiu na pesagem, com exatidão, de aproximadamente 1g da droga vegetal, para Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada fervente. A mistura foi mantida sob fervura durante 30 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, o material foi filtrado diretamente para um balão volumétrico de 100 mL, e completou-se o volume com água destilada através do filtro. O filtrado obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa, pipetando-se alíquotas crescentes do líquido, com acréscimos de 1,0 mL, iniciando em 1,0 mL até 10,0 mL. Posteriormente, ajustou-se o volume dos primeiros 9 tubos para 10,0 mL com água destilada. Os tubos foram agitados com movimentos verticais por 15 segundos e em seguida, deixados em repouso por 15 minutos. Com

o auxílio de uma régua mediu-se a altura da espuma resultante em cada tubo. Segundo a Farmacopeia Brasileira, se a altura da espuma de todos os tubos for inferior a 1 cm, o índice de espuma é tido como menor do que 100. Caso a altura da espuma medida seja igual a 1 cm em algum dos tubos, a diluição relativa a esse tubo é o índice observado. Por fim, se a altura da espuma for maior do que 1 cm em todos os tubos, o índice de espuma é maior do que 1000 (ANVISA, 2019a).

4.3.3 Análises cromatográficas por CLUE-UV/DAD

A droga vegetal de *Costus spiralis* e a flavona C-glicosilada escafosídeo, utilizado como padrão de referência, foram submetidos a análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a detector de absorção Ultravioleta e Detector de Arranjo de Diodos (CLUE-UV/DAD). O preparo das amostras e condições cromatográficas empregados a seguir foram previamente descritos por Amorim (2017) para método analítico desenvolvido e validado para quantificação de flavonas C-glicosiladas em extrato de folhas da espécie.

4.3.3.1 Substâncias químicas de referência

Para análises cromatográficas, empregou-se padrão caracterizado de escafosídeo obtido da Aktin Chemicals (China) com potência de 98,95% (lote SC-160109) e padrão primário vicenina-2 da Sigma-Aldrich-Merck com potência de 82,00% (lote HWI01702-1).

4.3.3.2 Preparo das soluções

As amostras descritas a seguir foram preparadas utilizando-se solventes grau CLAE e água ultrapurificada.

4.3.3.2.1 Solução padrão estoque de vicenina-2

Pesou-se, com exatidão, cerca de 1,0 mg de vicenina-2 para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com solução de água e metanol na proporção 70:30.

4.3.3.2.2 Solução padrão estoque de escafosídeo

Pesou-se, com exatidão, cerca de 1,0 mg de escafosídeo para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com solução de água e metanol na proporção 70:30.

4.3.3.2.3 Solução de referência

Transferiu-se 300 μ L da solução padrão estoque de escafosídeo e 180 μ L da solução padrão estoque de vicenina-2 para balão volumétrico de 1,0 mL e completou-se o volume com solução de água e metanol na proporção 70:30. A solução resultante foi filtrada diretamente para vial em filtro de seringa acoplado a membrana de PVDF de 0,22 nm.

4.3.3.2.4 Preparo da solução amostra

Pesou-se, com exatidão, 1,0 g da droga vegetal em Erlenmeyer de 125 mL e adicionaram-se 20 mL de solução de metanol:água 80:20. Realizou-se a extração em banho de ultrassom por 20 minutos. Aguardou-se a decantação do material vegetal e filtrou-se o sobrenadante em algodão. O filtrado foi recolhido em balão de fundo redondo de 125 mL e reservado. Retornou-se o algodão para o Erlenmeyer contendo o material vegetal. Procederam-se a mais duas extrações seguindo o procedimento descrito anteriormente. Os filtrados obtidos foram reunidos. Em seguida, secou-se o extrato resultante em evaporador rotatório, com temperatura máxima do banho de 50 °C, até o resíduo. Transferiu-se quantitativamente o resíduo resultante, com auxílio de solução de metanol grau CLAE e água ultrapurificada, na proporção de 30:70 e ultrassom, para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com solução de água:metanol 70:30. Transferiu-se cerca de 2,0 mL da solução resultante para microtubo plástico e centrifugou-se a 9184 g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa com membrana de PVDF de 0,22 μ m para *vials* de 2 mL.

4.3.3.3 Condições cromatográficas

Utilizou-se sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC Acquity System® acoplado a detector UV/DAD, Coluna Acquity UPLC® BEH C18 (100 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm) e Pré-coluna VanGuard™ C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm). A temperatura do forno foi ajustada em 30 °C e o fluxo em 0,25 mL/min. Empregou-se gradiente linear utilizando água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico, metanol grau CLAE acidificado com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila grau CLAE, conforme descrito na **Tabela 1**. O volume de injeção foi de 2,0 µL e os cromatogramas foram registrados na faixa de λ 210 a 600 nm.

Tabela 1 – Gradiente de eluição empregado para as análises cromatográficas por CLUE-UV/DAD para análise das folhas de *Costus spiralis*

Tempo (minutos)	H ₂ O + 0,1% HCOOH (%)	MeOH + 0,1% HCOOH (%)	ACN (%)
0,0	90	10	-
1,0	75	25	-
18,0	65	35	-
18,1	5	-	95
20,0	5	-	95
21,0	90	10	-
25,0	90	10	-

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: ACN = acetonitrila; MeOH = metanol.

4.3.3.4 Desenvolvimento e validação de método para identificação da droga vegetal de *Costus spiralis* por CLUE-UV/DAD

Método analítico por CLUE-UV/DAD foi desenvolvido e validado como uma proposta de método para teste de identificação da droga vegetal de *Costus spiralis*. O método proposto e os procedimentos para validação do método estão descritos a seguir. Os cromatogramas foram processados em λ 335 nm.

4.3.3.4.1 Descrição do método proposto

Injetar, separadamente, 2,0 µL da solução referência (solução de vicenina-2 e escafósídeo - item 4.3.3.2.3) e 2,0 µL da solução amostra de *Costus spiralis* nas condições cromatográficas descritas no item 4.3.3.3. O cromatograma da solução amostra deve apresentar dois picos identificados como vicenina-2 e escafósídeo, e mais 4 picos de flavonas C-glicosiladas identificadas como isômeros do escafósídeo, conforme tempos de retenção relativos (TRR) apresentados na **Tabela 2**. Os picos em questão devem apresentar resolução $\geq 1,5$, assimetria $\geq 0,8$ e $\leq 1,2$ e espectro de UV compatível com os observados para vicenina-2 e escafósídeo, com dois máximos de absorção, sendo um entre λ 268 e 272 nm e outro entre λ 333 e 335 nm. Não são observados picos intensos entre os TRR 1,4 e 2,30.

Tabela 2 – Tempos de retenção relativos dos picos de flavonas C-glicosiladas na solução amostra das folhas de *Costus spiralis*

Escafósídeo	1,00
Vicenina-2	0,72
Flavona C-glicosilada 1*	0,88
Flavona C-glicosilada 2*	0,94
Flavonas C-glicosilada 3*	1,27
Flavona C-glicosilada 4*	1,34

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: *Isômeros do escafósídeo

4.3.3.4.2 Validação do método proposto

O método proposto foi validado conforme RDC nº 166 de 2017 da ANVISA (ANVISA, 2017), avaliando-se os parâmetros de Seletividade, Robustez e Estabilidade de Soluções conforme preconizado pela legislação citada para métodos de identificação.

4.3.3.4.2.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade analisou-se a solução de referência (item 4.3.3.2.3), a solução amostra e uma solução amostra de *Costus spicatus*, preparada da mesma forma que descrito

para amostra de *Costus spiralis* (item 4.3.3.2.4). Os perfis cromatográficos das duas drogas vegetais deveriam ser distintos.

4.3.3.4.2.2 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada pelo método estatístico proposto por Youden e Steiner (1975). Solução de referência (item 4.3.3.2.3) e solução amostra (item 4.3.3.2.4) foram analisadas em diferentes condições. Conforme teste de Youden sete parâmetros analíticos foram selecionados para avaliação, sendo que cada um foi testado em seu valor nominal, representado por letras maiúsculas, e com uma pequena variação, indicado por letras minúsculas, resultando em 8 (oito) ensaios distintos. Tais parâmetros, bem como a distribuição das variáveis para cada ensaio estão descritos na **Tabela 3**. Avaliou-se a manutenção do perfil cromatográfico em cada condição, com identificação dos TRR, resolução, assimetria e espectro de UV dos picos listados na **Tabela 2**.

Tabela 3 – Descrição das variáveis para avaliação da robustez do método de para identificação da droga vegetal de *Costus spiralis*

Parâmetros	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A Lote 1	A Lote 1	A Lote 1	A Lote 1	a Lote 2	a Lote 2	a Lote 2	a Lote 2
B,b	B Menor	B Menor	b Maior	b Maior	B Menor	B Menor	b Maior	b Maior
C,c	C Sim	c Não	C Sim	c Não	C Sim	c Não	C Sim	c Não
D,d*	D 90:10 (A:B)	D 90:10 (A:B)	d 89:11 (A:B)	d 89:11 (A:B)	d 89:11 (A:B)	d 89:11 (A:B)	D 90:10 (A:B)	D 90:10 (A:B)
E,e	E 335	e 333	E 335	e 333	e 333	E 335	e 333	E 335
F,f	F 30	f 33	f 33	F 30	F 30	f 33	f 33	F 30
G,g	G 0,25	g 0,24	g 0,24	G 0,25	g 0,24	G 0,25	G 0,25	g 0,24
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: parâmetros: A,a = Lote da coluna cromatográfica; B,b = Tempo de extração da amostra em ultrassom (minutos); C,c = Adição de HCOOH à fase orgânica (metanol); D,d = Composição inicial da fase móvel (%); E,e = Comprimento de onda (nm); F,f Temperatura do forno (°C); G,g = Fluxo da fase móvel (mL/min); Lote 1 = 02613522011; Lote 2 = 0268353352; tempo de extração menor = 15 minutos; tempo de extração maior = 20 minutos. A = água; B = metanol. *No parâmetro D,d (composição inicial da fase móvel) o metanol e água ultrapurificada foram acidificados em 0,1% de CH₂O₂.

4.3.3.4.2.3 Estabilidade de soluções

A estabilidade das soluções de referência (item 4.3.3.2.3) e amostra (item 4.3.3.2.4) foram avaliadas injetando-se as duas soluções imediatamente após o preparo e em intervalos regulares em até 24 horas após o preparo. São consideradas estáveis variações de até 2% nas áreas obtidas.

4.3.3.5 Quantificação de flavonas C-glicosiladas na droga vegetal de *Costus spiralis*

Utilizando método analítico previamente validado por Amorim (2017), determinou-se o teor de escafósídeo, vicenina-2 e flavonas C-glicosiladas totais calculadas como escafósídeo. Para tanto, solução padrão de escafósídeo e a solução amostra de *Costus spiralis* foram analisadas

nas condições cromatográficas descritas no item 4.3.3.3, sendo os cromatogramas analisados em λ 335 nm.

Para o preparo da solução padrão de escafósídeo, transferiu-se 300 μ L da solução padrão estoque de escafósídeo (item 4.3.3.2.2) para balão volumétrico de 1,0 mL e completou-se o volume com solução de água e metanol na proporção 70:30. A solução resultante foi filtrada diretamente para vial em filtro de seringa acoplado a membrana de PVDF de 0,22 nm. Já a solução amostra foi preparada conforme descrito no item 4.3.3.2.4.

A solução padrão de escafósídeo foi injetada em quintuplicata para avaliação dos parâmetros de adequabilidade. A solução amostra foi analisada em triplicata, ou seja, foram realizados 3 preparos individuais da droga vegetal, e cada solução injetada uma vez. Para identificação das flavonas C-glicosiladas foram utilizados os tempos de retenção relativos apresentados na **Tabela 2**.

O teor de escafósídeo, vicenina-2 e flavonas C-glicosiladas totais calculadas como escafósídeo foram obtidos conforme equações apresentadas a seguir:

$$\%escafósídeo = \frac{[Padr\tilde{a}o] \times AEa \times 100}{AEp \times Ma}$$

$$\%vicenina\ 2 = \frac{[Padr\tilde{a}o] \times AVa \times Fc \times 100}{AEp \times Ma}$$

$$\%flavonas\ C - glicosiladas\ calculadas\ como\ escafósídeo = \frac{[Padr\tilde{a}o] \times A\Sigma \times AFc \times 100}{Ap \times Ma}$$

Sendo:

[Padrão] = Concentração da solução padrão de escafósídeo (mg/ml)

AEa = Área do pico de escafósídeo na solução amostra

AEp = Área do pico de escafósídeo na solução padrão

AvA = Área do pico de vicenina na solução amostra

Fc = Fator de correção para cálculo do teor de vicenina (1,25). Valor determinado na validação prévio do método analítico

Σ *AFa* = Somatório das áreas de flavonas C-glicosiladas

Ma = Massa de droga vegetal (1,0 g)

4.3.4 Desenvolvimento e validação de método para identificação da droga vegetal de *Costus spiralis* por Cromatografia em Camada Delgada

Método analítico por cromatografia em camada delgada foi desenvolvido e validado como uma proposta de método de identificação para a droga vegetal de *Costus spiralis*. O preparo das soluções foi desenvolvido com base nos procedimentos descritos para as análises por CLUE-UV/DAD. As condições cromatográficas foram adaptadas daquelas descritas por Wosch e colaboradores (2017). O método proposto e os procedimentos para validação do método estão descritos a seguir.

4.3.4.1 Substâncias químicas de referência

Para análises cromatográficas empregou-se padrão caracterizado de escafósídeo obtido da Aktin Chemicals (China) com potência de 98,95% (lote SC-160109) e padrão primário de vicenina-2 da Sigma-Aldrich-Merck com potência de 94,12% (lote HW101219-1).

4.3.4.2 Preparo das soluções

4.3.4.2.1 Solução padrão estoque de vicenina-2

Pesaram-se 2,5 mg de vicenina-2 para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20.

4.3.4.2.2 Solução padrão estoque de escafósídeo

Pesaram-se 2,5 mg de escafósídeo para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20.

4.3.4.2.3 Solução padrão de vicenina-2

Transferiu-se 180 µL da solução padrão estoque de vicenina-2 para balão volumétrico de 1,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20. A solução resultante foi filtrada diretamente para vial em filtro de seringa acoplado a membrana de PVDF de 0,22 nm.

4.3.4.2.4 Solução padrão de escafósídeo

Transferiu-se 300 µL da solução padrão estoque de escafósídeo para balão volumétrico de 1,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20. A solução resultante foi filtrada diretamente para vial em filtro de seringa acoplado a membrana de PVDF de 0,22 nm.

4.3.4.2.5 Solução padrão de vicenina-2 e escafósídeo

Transferiu-se 300 µL da solução padrão estoque de escafósídeo e 180 µL da solução padrão estoque de vicenina-2 para balão volumétrico de 1,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20. A solução resultante foi filtrada diretamente para vial em filtro de seringa acoplado a membrana de PVDF de 0,22 nm.

4.3.4.2.6 Solução amostra

Pesou-se 1,0 g da droga vegetal de *Costus spiralis* em Erlenmeyer de 125 mL, separadamente e adicionaram-se 20 mL de solução de metanol:água 80:20. Realizou-se a extração em banho de ultrassom por 20 minutos. Aguardou-se a decantação do material vegetal e filtrou-se o sobrenadante em algodão. O filtrado foi recolhido em balão de fundo redondo de 125 mL e reservado. Retornou-se o algodão para o Erlenmeyer contendo o material vegetal. Procederam-se mais duas extrações seguindo o procedimento descrito anteriormente. Os filtrados obtidos foram reunidos. Em seguida, secou-se o extrato resultante em evaporador rotatório, com temperatura máxima do banho de 50 °C, até o resíduo. Transferiu-se quantitativamente o

resíduo resultante, com auxílio de solução de metanol grau CLAE e água ultrapurificada, na proporção de 80:20 e ultrassom, para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com solução de água:metanol 80:20. Centrifugou-se por 10 minutos a 420 g e aplicou-se o sobrenadante na placa cromatográfica.

4.3.4.3 Condições cromatográficas

Empregou-se como fase estacionária placa cromatográfica de sílica-gel F254 (0,250 mm) (Merck) e como fase móvel solução acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água na proporção 10:1.1:1.1:2.5.

4.3.4.4 Procedimento

Aplicou-se na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 20 µL da solução padrão de vicenina-2 e escafosídeo (item 4.3.5.2.4) e 20 µL da solução amostra (item 4.3.5.2.5). A eluição foi realizada até que o eluente percorresse 10 cm do ponto de aplicação e, posteriormente, após secagem ao ar, a cromatoplaça foi nebulizada com solução de difenilborato de aminoetanol 1% em metanol, seguido de solução de macrogol 1500 a 5% (p/v) em metanol. A placa foi seca com secador industrial e em seguida foi examinada sob a luz ultravioleta em λ 365 nm. No esquema apresentado na **Figura 8** há as sequências de zonas, referentes às substâncias presentes, que devem ser obtidas com a solução referência e a solução amostra.

Figura 8 – Esquema dos resultados do teste de identificação da droga vegetal de *Costus spiralis*

Parte superior da placa	
	Zona de fluorescência alaranjada Zona de fluorescência alaranjada Zona de fluorescência amarela Zona de fluorescência alaranjada Zona de fluorescência esverdeada Zona de fluorescência esverdeada Zona de fluorescência esverdeada
Zona de fluorescência esverdeada (escafósídeo) Zona de fluorescência esverdeada (vicenina-2)	
Solução padrão	Solução amostra

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.3.4.5 Validação do método

O método proposto foi validado conforme RDC nº 166 de 2017 da ANVISA (2017), avaliando-se os parâmetros de seletividade, robustez e estabilidade de soluções conforme preconizado pela legislação citada para métodos de identificação. As condições cromatográficas empregadas e o procedimento de análise foram os mesmos descritos nos itens 4.3.3.3 e 4.3.3.4, alterando-se apenas as soluções analisadas, de acordo com o parâmetro avaliado, conforme descrito a seguir.

4.3.4.5.1 Avaliação da seletividade

Para avaliação da seletividade do método aplicou-se em placa cromatográfica de aproximadamente 13 cm, 20 µL de solução de metanol:água (80:20), solução padrão de vicenina-2 (4.3.5.2.4), solução padrão de escafosídeo (4.3.5.2.5), solução padrão de vicenina-2 e escafosídeo (4.3.5.2.6) solução amostra (4.3.5.2.7) e uma solução preparada da mesma forma que a solução amostra, mas utilizando as folhas de *Costus spicatus*.

4.3.5.5.2 Avaliação da robustez

Para avaliação da robustez aplicou-se em placa cromatográfica de tamanho apropriado 20 µL de solução padrão de vicenina-2 e escafosídeo (4.3.5.2.6) e duas soluções amostras, sendo uma preparada conforme descrito 4.3.5.2.7 e outra alterando-se o tempo de extração em ultrassom para 15 minutos.

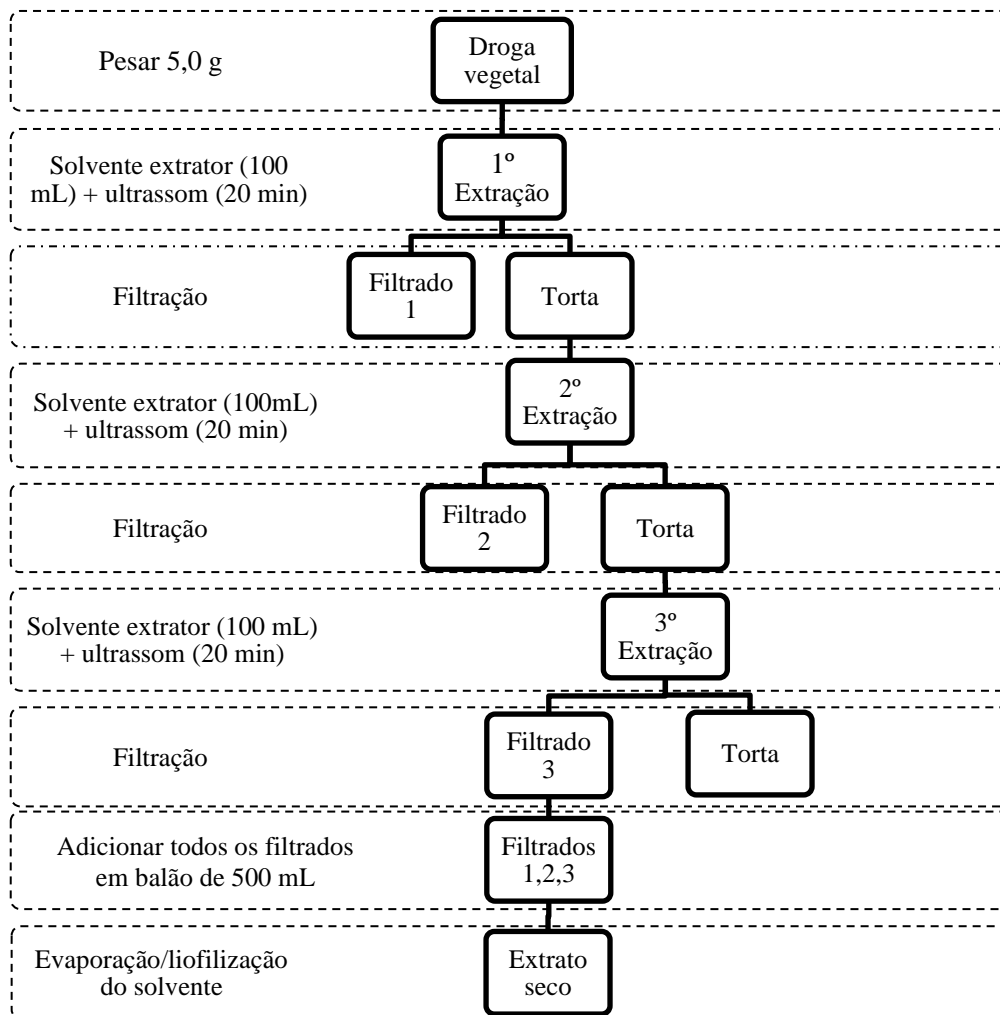
4.3.4.5.3 Avaliação da estabilidade de soluções

Para avaliação da estabilidade de soluções aplicou-se em placa cromatográfica de tamanho apropriado 20 µL de solução padrão de vicenina-2 e escafosídeo (4.3.5.2.4) e da solução amostra (4.3.5.2.5) imediatamente após o preparo, repetindo-se o procedimento após 24 horas com as mesmas soluções.

4.4 Obtenção de extratos ricos em flavonas C-glicosiladas das folhas de *Costus spiralis*

Para obtenção dos extratos ricos em flavonoides porções do material vegetal seco e pulverizado (840 µm) foram submetidos à maceração com diferentes solventes com auxílio de banho ultrassônico. Foram avaliadas soluções hidroetanólicas com 80%, 50% e 30% de etanol e água em ebulição. Os extratos obtidos foram denominados EHE, EHE50%, EHE30% e EAQ, respectivamente. Para cada um dos solventes foi empregado método de extração desenvolvido previamente por Amorim (2017) apresentado na **Figura 9** e descrito a seguir (AMORIM, 2017; CASTILHO *et al.*, 2021).

Figura 9 – Esquema do procedimento de extração da droga vegetal



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.4.1 Descrição do método extrativo

Porções da droga vegetal de *Costus spiralis* (5,0 g) foram submetidas à extração com diferentes solventes com auxílio de banho ultrassônico. A droga vegetal foi pesada em erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 100 mL do solvente extrator. A extração foi realizada por maceração com o auxílio de banho de ultrassom por 20 minutos. Posteriormente, aguardou-se a decantação do material vegetal e o sobrenadante foi filtrado em algodão. O filtrado foi recolhido em balão de fundo redondo de 500 mL e reservado. Retornou-se o algodão para o erlenmeyer contendo o resíduo de material vegetal e foram realizadas mais duas extrações seguindo o procedimento descrito. Todos os filtrados foram reunidos e, em seguida, o extrato resultante foi seco em

evaporador rotatório com temperatura máxima do banho de 50 °C, até a eliminação total da porção alcoólica, quando pertinente. Posteriormente, o resíduo aquoso foi congelado a -80 °C e liofilizado (**Figura 9**). O ensaio foi realizado em triplicata para cada solvente extrator avaliado.

4.4.2 Planejamento experimental para avaliação das condições de extração

Planejamento experimental, do inglês *Design of Experiments* (DoE), foi realizado para avaliar as melhores condições para a extração de flavonas C-glicosiladas a partir da droga vegetal de *Costus spiralis* utilizando como base o método descrito no item 4.4.1. Um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} foi empregado para medir os efeitos dos seguintes fatores na extração desses compostos: tempo (10 e 20 minutos) e temperatura de sonicação (30 °C e 40 °C), número de extrações (3 e 5), volume de solvente extrativo (50 e 100 mL) e porcentagem de etanol no solvente (0% e 80%). O ponto central foi avaliado em triplicata. O espaço ideal de projeto foi determinado visando um mínimo de 0,35% para vicenina-2, 0,4% de escafosídeo e 2,1% para flavonoides totais. Estes valores equivalem a uma redução de aproximadamente 15% dos valores obtidos com o método original para extrato hidroetanólico 80% das folhas de *C. spiralis* (vide **Quadro 3**) (AMORIM, 2017; CASTILHO *et al.*, 2021). O software *Stat-Ease Design Expert* 12.0 foi utilizado para processamento dos dados e avaliação dos resultados. O estudo foi realizado com a colaboração do doutorando Pedro Henrique Cavalcanti Franco (Max-Planck Institute for Biophysics, Frankfurt).

4.4.3 Obtenção de decocto das folhas de *Costus spiralis*

Decocto das folhas de *Costus spiralis* foi preparado adicionando 15,0 g do material vegetal seco em 100 mL de água ambiente. A mistura foi aquecida até a ebulição, e, posteriormente, mantida nessa condição por 10 minutos. Após resfriamento e decantação do material vegetal, procedeu-se à filtração e, em seguida, o filtrado foi congelado a -80° e liofilizado. O derivado vegetal seco obtido a partir do decocto será denominado apenas como decocto no presente estudo. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5 Análise dos derivados vegetais obtidos por CLUE-UV/DAD

O perfil cromatográfico por CLUE-UV/DAD dos derivados vegetais foram obtidos e quantificados em relação aos teores de escafosídeo, vicenina II e flavonas C-glicosiladas totais calculadas como escafosídeo, utilizando método analítico por CLUE-UV/DAD desenvolvido e validado previamente (AMORIM, 2017). O método analítico segue o mesmo procedimento empregado para análise quantitativa da droga vegetal descrito no item 4.3.3.5, alterando-se apenas o preparo da amostra, que foi realizado conforme descrito a seguir. Cromatogramas foram obtidos em λ 335 e λ 270 nm. Foram utilizados padrão de referência de escafosídeo e vicenina-2, já descritos, e de epicatequina, epigallocatequina e galato de epicatequina, todos da marca Sigma-Aldrich visando a identificação dessas substâncias.

Os ensaios descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.3 foram realizados em triplicata, ou seja, foram obtidos 3 extratos para cada solvente extrator e 3 amostras de decocto. Cada derivado vegetal foi analisado em triplicata gerando um total de 9 determinações por amostra. No caso dos extratos obtidos no planejamento experimental, cada condição gerou uma única amostra que foi analisada em triplicata, exceto o ponto central, para o qual foram preparadas 3 amostras também quantificadas em triplicata.

A partir das análises realizadas, os extratos obtidos conforme método descrito no item 4.5.1 empregando-se como solvente extrator água e solução hidroetanólica 80%, denominadas de EAQ e EHE, respectivamente, foram selecionados para a condução dos demais testes de caracterização físico-química e ensaios biológicos.

4.5.1 Preparo da solução amostra

Pesaram-se, com exatidão, cerca de 5,0 mg de cada derivado vegetal, obtidos conforme descrito no item 4.4.1 e 4.4.3, para balão volumétrico e adicionou-se aproximadamente 0,9 mL de mistura de água ultrapura e metanol grau CLAE na proporção de 7:3. O extrato foi solubilizado com auxílio de ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com a mesma mistura de

água:metanol e, em seguida, a solução resultante foi centrifugada a 9184 g por 10 minutos. Filtrou-se o sobrenadante em filtro de PVDF de 0,22 µm (Merck) para vials de 2 mL.

4.6 Caracterização química de extratos das folhas de *Costus spiralis*

4.6.1 Perda por dessecação e índice de espuma

Os extratos foram submetidos ao teste de perda por dessecação e índice de espuma, conforme descrito para droga vegetal nos itens 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente.

4.6.2 Prospecção fitoquímica por CCD

Realizou-se prospecção fitoquímica para a pesquisa da presença de flavonoides, taninos, saponinas, carboidratos, triterpenos e esteroides em EHE e EAQ. Os procedimentos empregados estão descritos no **Quadro 6**.

Avaliou-se a presença de flavonoides nos extratos utilizando método adaptado daquele utilizado para identificação da droga vegetal (item 4.3.3.4.1). A detecção de carboidratos foi realizada por método adaptado descrito por Chaves (1997) e as demais classes segundo procedimento realizado anteriormente por Amorim (2013) para prospecção fitoquímica em extrato etanólico de *Costus spiralis*.

Para cada condição, aplicaram-se na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 20 µL da solução padrão e 20 µL de cada solução amostra. A eluição foi realizada até que o eluente percorresse 10 cm do ponto de aplicação e, posteriormente, após secagem ao ar, realizou-se a revelação conforme descrito no **Quadro 6**. Em todas as análises utilizou-se como fase estacionária placa cromatográfica de sílica-gel GF254 (0,250 mm) DC-Fertigoflien ALUGRAM® (Macherey-nagel).

4.6.2.1 Soluções reveladoras

4.6.2.1.1 Lieberman-Burchard

Adicionaram-se duas gotas de ácido sulfúrico concentrado à 10 mL de anidrido acético.

4.6.2.1.2 Solução de ácido sulfúrico 5% e solução de vanilina 1%

Para preparo da solução ácida, adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado à balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água. A solução de vanilina foi preparada solubilizando-se 1g de vanilina em 100 mL de etanol. Para revelação das placas, primeiramente borrifou-se a solução de ácido sulfúrico, e em seguida, a solução de vanilina.

Quadro 6 – Condições empregadas para prospecção fitoquímica realizada para extrato hidroetanólico 80% (EHE) e extrato aquoso (EAQ) de *Costus spiralis*

Classe de metabólitos secundários	Preparo das soluções padrão e amostra	Fase móvel	Revelação e detecção	Referências
Flavonoides	<p>Solução padrão: pesaram-se 2,5 mg de vicenina-2 e escafosídeo separadamente para balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20. Transferiu-se 180 µL da solução de vicenina-2 e 300 µL da solução de escafosídeo para balão volumétrico de 1,0 mL e completou-se o volume com solução de metanol e água na proporção 80:20</p> <p>Solução amostra: pesaram-se 50,0 mg de cada extrato separadamente em tubos plásticos e adicionaram-se 5,0 mL de mistura de metanol:água (80:20). Os extratos foram solubilizados com auxílio de ultrassom por 15 minutos e, em seguida, centrifugados a 420 g por 10 minutos. Aplicou-se em placa cromatográfica 20 µL do sobrenadante.</p>	Acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (10:1.1:1.1:2.5)	A cromatoplaça foi nebulizada com solução de difenilborato de aminoetanol 1% em metanol, seguido de solução de macrogol 1500 a 5% (p/v) em metanol. A placa foi seca com secador industrial e em seguida foi examinada sob a luz ultravioleta em λ 365 nm. Flavonoides formam manchas de fluorescência amarela, laranja, verde ou azul.	Amorim (2017); Wagner e Bladt (1996); Wosch <i>et al.</i> (2017).
Taninos	<p>Solução padrão: pesaram-se 1,0 mg de epicatequina (Sigma-aldrich) que foi dissolvido em 1,0 mL em solução de metanol:água 80:20.</p> <p>Solução amostra: utilizaram-se as soluções preparadas para identificação de flavonoides.</p>	Clorofórmio: acetona: ácido fórmico (65:27:8).	A cromatoplaça foi nebulizada com cloreto férrico a 2% m/v em etanol. Taninos formam manchas negro-azuladas ou negro esverdeadas no visível.	Amorim (2013); Wagner e Bladt (1996)
Carboidratos	<p>Solução padrão: pesaram-se 2,0 mg de glicose para microtubo plástico que foi solubilizado em 1,0 mL de água. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para outro microtubo contendo 0,5 mL de etanol.</p> <p>Soluções amostra: pesaram-se 60,0 mg de cada extrato separadamente em erlenmeyer. Realizou-se extração por infusão, com 15 mL de água fervente, por três vezes, filtrando-se o material em papel de filtro. Os filtrados foram reunidos e transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 1 mL desta solução para microtubo contendo 1,0 mL de etanol.</p>	Isopropanol:n-butanol:água:ácido acético (5:7:4:2)	A cromatoplaça foi nebulizada com solução de anisaldeído sulfúrico. A placa foi seca utilizando secador industrial. Carboidratos formam manchas negro-azulada ou negro esverdeadas.	Chaves (1997)

Quadro 6 (continuação) – Condições empregadas para prospecção fitoquímica realizada para extrato hidroetanólico 80% (EHE) e extrato aquoso (EAQ) de *Costus spiralis*

Classe de metabólitos secundários	Preparo das soluções padrão e amostra	Fase móvel	Revelação e detecção	Referências
Saponinas	Solução padrão: pesaram-se 2,0 mg de escina que foi dissolvida em 1,0 mL de mistura de etanol:água (70:30). Solução amostra: pesaram-se 50,0 mg de cada extrato separadamente em tubos plásticos e adicionou-se 5,0 mL de mistura de etanol:água (70:30). Os extratos foram solubilizados com auxílio de ultrassom por 15 minutos e, em seguida, centrifugados a 420 g por 10 minutos.	Clorofórmio: metanol: água (64:50:10).	A cromatoplaça foi nebulizada com ácido sulfúrico a 5% v/v em etanol seguido de vanilina a 1% m/v em etanol. As saponinas formam principalmente zonas azul, azul-violeta e, às vezes, vermelha ou amarelo-acastanhada no visível	Amorim (2013); Wagner e Bladt (1996).
Triterpenos e esteroides	<i>Solução padrão:</i> pesaram-se 1,0 mg de lupeol para microtubo plástico que foi solubilizado 1,0 mL de clorofórmio. <i>Solução amostra:</i> solubilizaram-se 10 mg de cada extrato separadamente em 5,0 mL de clorofórmio em banho de ultrassom por 15 minutos. Centrifugou-se a 420 g por 10 minutos.	Diclorometano: acetato de etila (1:1 v/v).	A cromatoplaça foi nebulizada com reagente de Liebermann–Burchard. Triterpenos pentacíclicos formam manchas pardas a vermelhas ou róseas escuras. Esteroides formam manchas azuis que mudam para verde persistente.	Amorim (2013); Wagner e Bladt (1996).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.6.3 Determinação de carboidratos totais

Determinou-se o teor de carboidratos totais em EAQ e EHE utilizando método farmacopeico para quantificação dessa classe de substâncias em folhas secas de *Stevia rebaudiana* (Estévia) preconizado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (ANVISA, 2019a). A única adaptação realizada foi em relação à tomada de amostra.

4.6.3.1 Preparo das soluções

4.6.3.1.1 Solução amostra estoque de EAQ e EHE

Pesaram-se, com exatidão, cerca de 60,0 mg de EAQ em Erlenmeyer. Realizou-se extração por infusão, com 80 mL de água quente, por três vezes, filtrando-se em seguida. Os filtrados foram reunidos e transferidos para balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água.

4.6.3.1.2 Solução amostra de EAQ e EHE

Transferiu-se 6,0 mL de cada solução estoque, separadamente, para tubos de ensaio, adicionando-se 0,6 mL de fenol a 5% (p/v) e 3,0 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos.

4.6.3.1.3 Solução branco

Transferiu-se 0,6 mL de água para tubo de ensaio, adicionando-se 0,6 mL de fenol a 5% (p/v) e 3,0 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos.

4.6.3.1.4 Solução e referência

Transferiu-se 0,6 mL de solução de glicose a 0,01% (p/v) em água, para tubo de ensaio, adicionando-se 0,6 mL de fenol a 5% (p/v) e 3 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos.

4.6.3.2 Procedimento

A absorvância das soluções amostra de EAQ e EHE e da solução referência foram determinadas em λ 490 nm, utilizando a solução branco para ajuste do zero. O teor de carboidratos totais foi expresso em g de carboidratos por 100 g de extrato (% , p/p), conforme cálculo a seguir:

$$\% \text{ carboidrato totais} = \frac{\text{Concentração da solução de glicose } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times \text{Abs Amostra} \times 25000}{\text{Abs Padrão} \times \text{Massa de extrato (mg)}}$$

Sendo:

Abs Padrão: absorvância da solução de referência

Abs Amostra: absorvância da solução amostra

4.6.4 Determinação de taninos

Determinou-se o teor de taninos em EAQ e EHE utilizando método geral preconizado na Farmacopeia Europeia (EDQM, 2022).

4.6.4.1 Preparo das soluções

4.6.4.1.1 Reagente fosfomolibdotúngstico

Adicionou-se 10,0 g de tungstato de sódio, 2,0 g de ácido fosfomolibdico e 5,0 mL de ácido fosfórico a 75,0 mL de água. A mistura foi mantida em refluxo por 2 horas. Após resfriamento até temperatura ambiente, ela foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água (ANVISA, 2010).

4.6.4.1.2 Solução amostra estoque

Pesaram-se, com exatidão, cerca de 1,00 g de extrato em balão de fundo redondo contendo 75 mL de água. A mistura permaneceu sob refluxo durante 30 minutos e em seguida foi filtrada quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água.

4.6.4.1.3 Soluções amostra de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele (PNA)

Em um béquer, adicionaram-se 0,10 g de pó de pele (Sigma-Aldrich) e 10,0 da solução amostra de estoque. A mistura foi deixada sob agitação mecânica por 60 minutos. Em seguida, foi filtrada e uma alíquota de 5,0 mL do filtrado transferida para balão de 25,0 mL, completando-se o volume com água. Alíquota de 2,0 mL dessa solução foi misturada a 1,0 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água em balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 29% m/v.

4.6.4.1.4 Soluções amostra de polifenóis totais (PT)

A alíquota de 5,0 mL da solução amostra estoque foi transferida para balão de 25,0 mL, completando-se o volume com água. Alíquota de 2,0 mL dessa solução foi misturada a 1,0 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água em balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 29% m/v.

4.6.3.1.5 Solução de referência

Imediatamente antes da análise, pesou-se 50,0 mg de pirrogalol (Sigma-Aldrich, 99%) que foi diluído em água e transferido para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se 5,0 mL dessa solução para balão volumétrico de 100,0 e o volume foi completado com água. Alíquota de 2,0 mL foi misturada a 1,0 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água em balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 29% m/v.

4.6.3.1.6 Procedimento

Após 30 minutos de reação determinou-se a absorbância das soluções amostra e solução de referência em λ 790 nm utilizando-se água como branco. O teor de taninos foi expresso em g de taninos por 100 g de extrato (% , p/p), conforme cálculo a seguir:

$$\% \text{ carboidrato total} = \frac{\text{Conc. da Sol. Padrão de pirrogalol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times (\text{Abs PT} - \text{Abs PNA}) \times 625.000}{\text{Abs Padrão} \times \text{Massa de extrato (mg)}}$$

Sendo:

Abs Padrão: absorbância da solução de referência

Abs PT: absorbância da solução amostra de polifenóis totais

Abs: PNA: absorbância da solução amostr de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele.

4.7 Caracterização dos extratos das folhas de *Costus spiralis* em ensaio químico de atividade antioxidante

EAQ e EHE foram caracterizados em relação a sua atividade em ensaio espectrofotométrico de redução do radical 1,1,difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

4.7.1 Preparo da solução estoque de DPPH

Diluiu-se 1,2 mg do DPPH em etanol em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma solução etanólica de DPPH a 300 μ M.

4.7.2 Preparo da solução estoque das amostras e controle positivo

Soluções de EAQ e EHE e do controle positivo de rutina, foram preparadas em água na concentração de 10 mg/mL. Posteriormente foram feitas diluições seriadas com acréscimos sucessivos de 750 μ L de etanol. As concentrações finais variaram de 25 a 1600 μ g/mL. Todas as soluções foram preparadas no dia do experimento e protegidas da luz até sua utilização.

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

Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µL das soluções das amostras e 40 µL da solução de DPPH. O controle negativo foi feito pela adição de etanol à solução de DPPH. Nos poços referentes aos brancos das amostras, 100 µL das amostras foram colocados em contato com 40 µL de etanol. Nos brancos dos controles negativo e positivo, somente o etanol foi adicionado. Posteriormente, a placa foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos para subsequente leitura em espectrofotômetro a λ 520 nm em leitor de microplacas (Tecan infinite, modelo M200PRO).

Os valores de absorvância quantificados para as amostras testadas foram transformados em porcentagens de atividade antioxidante (AA%), em relação ao controle negativo DPPH, que foram considerados 100. A % de atividade antioxidante foi calculada pela equação apresentada a seguir.

$$AA\% = \frac{(A_{DPPH} - A_{branco\ DPPH}) - (A_{amostra} - A_{branco\ amostra})}{(A_{DPPH} - A_{branco\ DPPH})} \times 100$$

Sendo:

A_{DPPH} = absorvância da solução de DPPH

$A_{branco\ DPPH}$ = absorvância da solução branco de DPPH

$A_{amostra}$ = absorvância da solução amostra

$A_{branco\ DPPH}$ = absorvância da solução branco da amostra

4.8 Avaliação da toxicidade pré-clínica de extratos das folhas de *Costus spiralis*

Os ensaios para avaliação da toxicidade pré-clínica foram realizados no LabTox (FAFAR/UFMG), com a colaboração das doutorandas Larissa Camila Ribeiro de Souza (Instituto de Ciência Biológicas - ICB/UFMG) e Letícia Barbosa Santos (FAFAR/UFMG).

4.8.1 Avaliação da citotoxicidade

4.8.1.1 Avaliação da citotoxicidade em células hepáticas

4.8.1.1.1 Cultura celular

EAQ e EHE foram avaliadas em ensaio de toxicidade *in vitro* em células HepG2 utilizando-se ensaio de redução do [Brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). Primeiramente, a solubilidade da amostra foi avaliada como recomendado como recomendado no guia da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) número 129 (OECD, 2010). As células foram cultivadas em monocamada em garrafas com meio de cultura Dullbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) complementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 IU/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 2 mM glutamina. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% CO₂ e umidade controlada.

4.8.1.1.2 Ensaio de redução de MTT

O teste de MTT (microcultura de tetrazólio) foi baseado no procedimento descrito por Araújo e colaboradores (2014). As células foram colocadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^3$ células/poço contendo 200 µL de DMEM com 10% de SFB e 1% de solução de penicilina/estreptomicina, e incubadas com 20 uL das amostras testadas em 8 concentrações (**Figura 10**) por um período de 24 h a 37 °C com 5% de CO₂. As soluções nas diferentes concentrações foram preparadas a partir de diluições seriadas de uma solução estoque (1,0 mg/mL). Em seguida, o meio contendo amostra foi removido e foram adicionados 180 µL de meio sem SFB e 20 µL de uma solução de MTT (5,0 mg/mL).

Figura 10 – Esquema da placa de 96 poços utilizada nos ensaios de avaliação da citotoxicidade de EAQ e EHE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	BC1	B – C1	B – C2	B – C3	B – C4	B – C5	B – C6	B – C7	B – C8	BC2	B
B	B	BC1	A-C1	A-C2	A-C3	A-C4	A-C5	A-C6	A-C7	A-C8	BC2	B
C	B	BC1	A-C1	A-C2	A-C3	A-C4	A-C5	A-C6	A-C7	A-C8	BC2	B
D	B	BC1	A-C1	A-C2	A-C3	A-C4	A-C5	A-C6	A-C7	A-C8	BC2	B
E	B	BC1	A-C1	A-C2	A-C3	A-C4	A-C5	A-C6	A-C7	A-C8	BC2	B
F	B	BC1	A-C1	A-C2	A-C3	A-C4	A-C5	A-C6	A-C7	A-C8	BC2	B
G	B	BC1	A-C1	A-C2	A-C3	A-C4	A-C5	A-C6	A-C7	A-C8	BC2	B
H	B	BC1	B – C1	B – C2	B – C3	B – C4	B – C5	B – C6	B – C7	B – C8	BC2	B

Fonte: Adaptado da OECD (2010).

Nota: B (branco) são os poços que contêm o veículo (DMSO), BC1 e BC2 (branco controle 1 e 2) são os poços de controle do veículo à esquerda (BC1) e à direita (BC2), que contêm células, meio de cultura e soluções reagentes (MTT ou vermelho neutro) e veículo. Os poços B-C1-C8 são os poços que contêm o meio de cultura de rotina e reagentes, mas não células. A (AMOSTRAS)-C1 -C8 são os poços relativos às amostras nas 8 concentrações avaliadas, sendo que C1 é a concentração mais alta e C8 é a mais baixa. Cada concentração foi testada em seis poços de replicatas. B-C1-C8 são poços que contêm a amostra nas 8 concentrações avaliadas, meio de cultura e reagentes, mas sem células. Os extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) das folhas de *Costus spiralis* foram avaliados nas seguintes concentrações 500,0, 359,7, 258,8; 186,2, 133,9, 96,3, 69,3, 49,9 µg/mL, exceto EHE no ensaio de MTT que foi avaliado nas seguintes concentrações: 200,0, 175,0, 150,0, 125,0, 100,0, 75, 50, 25,0 µg/mL.

As placas foram incubadas durante quatro horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. A solução de MTT, em seguida, foi removida, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço e agitou-se por 5 minutos em agitador automático para solubilização do precipitado formado. Mediu-se a absorbância em λ 570 nm em leitor de microplacas Tecan infinite, modelo M200PRO). Os ensaios foram realizados em triplicata, ou seja, foram analisadas 3 placas por extrato, utilizando para cada uma delas soluções estoque distintas das amostras. Em cada placa, as concentrações definidas foram avaliadas em sextuplicata (**Figura 10**). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles não tratados, valor utilizado para determinação do valor de IC₅₀ utilizando o software *GraphPad Prism 7.0*.

4.8.1.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método de captação do corante vermelho neutro para a estimativa da toxicidade oral aguda

4.8.1.2.1 *Cultura celular*

Para a realização desse ensaio foi utilizada a linhagem de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3-A31, gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO/Brasil). As células foram cultivadas em monocamada em garrafas com meio de cultura Dullbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina. Os fibroblastos foram mantidos em estufa a 37 °C, com 5% CO₂ e umidade controlada.

Após observação em microscópio invertido para verificação da confluência (60-80%) e avaliação de qualquer alteração morfológica, retirou-se o meio de cultura, a garrafa foi lavada com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e as células foram desagregadas quimicamente utilizando tripsina 0,02%. Após ressuspender as células com DMEM 10% SFB, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer.

4.8.1.2.2 *Captação pelo vermelho neutro*

O ensaio de citotoxicidade por captação do Vermelho Neutro foi realizado de acordo com o guia da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) número 129 (OECD, 2010) e validado no LabTox. Para isso, 3×10^3 células foram plaqueadas por poço em uma placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação, as placas foram observadas em microscópio invertido para avaliação de alterações, e então expostas às amostras em estudo, de acordo com o esquema abaixo (**Figura 10**) por 48 horas.

Após o tempo de exposição, adicionou-se 250 µL/poço do corante vermelho neutro (25 µg/mL) em DMEM 5% SFB, e as placas foram novamente incubadas por 3 horas. Todos os poços

foram, então, lavados com PBS e adicionados 100 µL/poço da solução de etanol: água: ácido acético (50:49:1).

As placas foram agitadas em agitador de placas por 20 minutos, protegidas da luz e em seguida, deixadas em repouso por 5 minutos. Posteriormente, as placas foram submetidas à leitura da absorbância em leitor de microplacas Tecan infinite (modelo M200PRO) em comprimento de onda de λ 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, da mesma forma que descrito para o ensaio de MTT e conforme esquema apresentado na **Figura 10**. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles não tratados, valor utilizado para determinação do valor de IC₅₀ utilizando o software *GraphPad Prism 7.0*. Determinou-se a classificação da segurança do extrato conforme *Globally Harmonized System* (GHS), elaborado pelas Nações Unidas e estimou-se a dose aguda tóxica conforme preconizada pela OECD (2010).

Para predição da dose tóxica empregou-se a seguinte equação:

$$\text{Dose tóxica} = 10^{(0,372 \times \log \text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2,024)}$$

4.8.2 Avaliação da toxicidade aguda in vivo

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com o método de classes para avaliação de toxicidade oral aguda descrito no guia da OECD 423 (OECD, 2001). O protocolo experimental (nº 129/2019) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (**ANEXO 1**).

Avaliou-se a toxicidade aguda *in vivo* de EAQ e EHE em ratos Wistar fêmeas, nulíparas, não prenhas, adultos jovens, com idade entre 8 e 12 semanas, fornecidas pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em temperatura ambiente (22 ± 3 °C), em sala com luminosidade e umidade controladas (50-60%). Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes da administração dos extratos e por 3 horas após a administração. Nos demais dias experimentais, água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Ao

final do período de observação, os animais foram anestesiados e eutanasiados por sobredose de anestésico.

4.8.2.1 Preparo das soluções

Os extratos EAQ e EHE foram ressuspensos em solução estéril de cloreto de sódio 0,9% nas concentrações aproximadas de 125,5 mg/mL e 62,5 mg/mL, respectivamente.

4.8.2.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n= 3 animais): CONTROLE (administração do veículo definido para solubilização do extrato), EAQ (administração de EAQ) e EHE (administração de EHE) e mantidos em gaiolas por um período 72 horas antes do início dos experimentos para ambientação. Após jejum prévio de 12 horas, os animais foram pesados e cada grupo recebeu os tratamentos por gavagem. Os animais dos grupos CONTROLE e EAQ recebem as soluções em dose única, enquanto o grupo EHE recebeu a administração dividida em duas doses, com diferença de 1 hora entre elas, devido a menor solubilidade de EHE em solução salina. Cada dose foi administrada em um volume aproximado de 3,5 mL. A alimentação foi liberada após 3 horas da administração dos tratamentos.

Na primeira etapa do teste, os extratos foram administrados por via oral na dose de 2000 mg/Kg no primeiro dia experimental (dia 0) (OECD, 2001). Após a administração, os animais foram observados por 8 horas com intervalos de 30 minutos, na primeira hora, depois após 1 hora, e então, de duas em duas horas. Posteriormente, os animais foram observados diariamente por 14 dias quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade, estresse, dor ou sofrimento (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Os sintomas avaliados incluem alterações no pelo e fezes, mudanças de temperamento, presença de secreção nos olhos e nariz e vocalização. A pontuação total média para os sinais avaliados foi calculada para cada dia experimental. A pontuação foi realizada de acordo com os critérios mencionados na tabela (**Tabela 4**), seguindo modelo adaptado de Atiq e colaboradores (2019).

Tabela 4 – Pontuação para os sintomas de distresse

Sintomas	1	2	3
Alterações no pelo	Alterações na aparência do pelo	Diminuição da pelagem em alguma parte do corpo	Diminuição da pelagem em várias partes do corpo
Alteração no temperamento	Animais agitados	Feridas nos olhos, nariz e patas	Alterações na postura
Vocalização	Animal vocalizando	-	-
Alteração nas fezes	Diarreia ou alteração na consistência das fezes	-	-
Secreções avermelhadas no nariz e olho	Presença de secreções	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Sendo constatada a ausência de mortalidade nos grupos EAQ e EHE, o teste seguiu para a segunda etapa mantendo as condições e repetindo-se a avaliação da dose de 2000 mg/Kg para ambos os extratos (OECD, 2001). Ao final de todos os experimentos, os animais foram eutanasiados, seus órgãos observados macroscopicamente quanto à alteração de cor, formato e tamanho, e então o fígado e os rins foram removidos e pesados. Determinou-se a porcentagem de massa renal e hepática em relação à massa corporal.

Após a pesagem, os rins e o fígado foram fixados em formaldeído tamponado, e posteriormente, conservados em álcool a 70% que foi trocado diariamente até o clareamento do órgão e o processamento histológico. Após inclusão em parafina, os tecidos foram fatiados em cortes de 4 µm e corados pela técnica da hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas em microscopia convencional com auxílio de uma câmera fotográfica digital para registro das imagens. A análise das lâminas foi realizada pelo Prof. Dr. Ênio Ferreira (Faculdade de Veterinária/UFMG).

4.8.2.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism versão 7.0*. Todos os dados foram inicialmente avaliados quanto à distribuição pelo teste de normalidade

Shapiro-Wilk. Confirmada a distribuição normal dos dados, utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA One Way) ou ANOVA two way para medidas repetidas ao longo do tempo, ambas seguidas de pós teste de Tukey. Foram consideradas significativas diferenças com o valor de p inferior a 0,05.

4.9 Avaliação do efeito de extratos das folhas de *Costus spiralis* em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina *in vivo*

O efeito EAQ e EHE na recuperação da função renal foi avaliado em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina. O protocolo experimental (nº 233/2018) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (**ANEXO 2**). Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Experimentação Animal do Laboratório de Toxicologia (LabTox) (FAFAR/UFMG) com a colaboração da doutoranda Larissa Camila Ribeiro de Souza (ICB/UFMG).

4.9.1 Animais

Foram utilizados ratos machos, adultos jovens, com idade entre 8 e 10 semanas, da linhagem Wistar, oriundos do biotério da FAFAR (UFMG), pesando em média $225 \text{ g} \pm 31 \text{ g}$. Os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro de 12 horas em gaiolas metabólicas, com período de ambientação de 72 horas antes do início dos experimentos. A temperatura ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade (50-60%) foram controladas durante todo o período experimental. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*, exceto uma hora antes da administração oral dos tratamentos, quando os animais ficaram em jejum.

4.9.2 Delineamento experimental

A indução da nefropatia foi realizada por meio de injeção intravenosa (IV) única de doxorrubicina na cauda dos animais na concentração de 7,5 mg/kg no primeiro dia experimental (dia 0), após serem anestesiados com injeção intraperitoneal (IP) de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (PEREIRA, 2013). Os animais foram randomizados em seis grupos (n=8):

- 1) CONTROLE: os animais receberam solução salina por gavagem simulando a administração o extrato;
- 2) DOXORRUBICINA (DOX): os animais receberam solução salina por gavagem simulando a administração do extrato e injeção IV de doxorubicina;
- 3) DOXORRUBICINA + LOSARTANA (DOX + LOS): os animais receberam losartana na dose 15 mg/Kg por gavagem e injeção IV de doxorubicina;
- 4) DOXORRUBICINA + EXTRATO AQUOSO (DOX + EAQ): os animais receberam o EAQ na dose de 5 mg/Kg por gavagem e injeção IV de doxorubicina;
- 5) DOXORRUBICINA + EXTRATO HIDROETANÓLICO 80% (DOX + EHE): os animais receberam o EHE na dose de 5 mg/Kg por gavagem e injeção IV de doxorubicina;

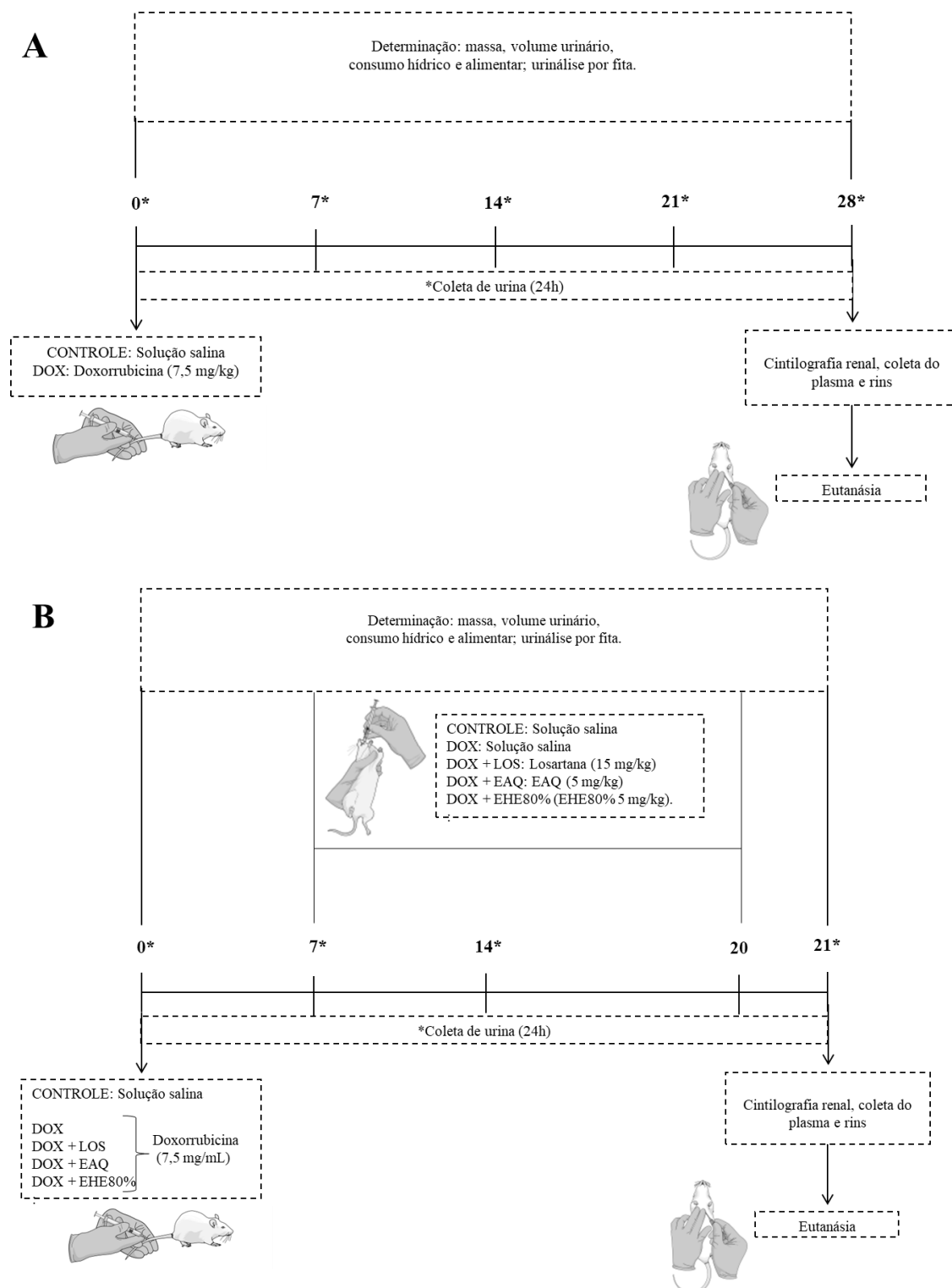
Os extratos e a losartana foram administrados por gavagem em volumes que variaram de 1,5 a 2,5 mL de acordo com a massa dos animais para ajuste da concentração. A solução salina foi administrada por via oral sempre no volume de 2 mL.

A losartana foi utilizada como controle positivo, uma vez que é usualmente utilizada para o controle de proteinúria em pacientes com síndrome nefrótica (BRASIL, 2021). A dose do fármaco foi definida de acordo com o estudo conduzido por Muñoz e colaboradores (2011) utilizando o mesmo modelo experimental em condições semelhantes às empregadas no presente estudo. Já a dose dos extratos foi definida considerando o resultado positivo obtido previamente para extrato etanólico 80% de *Costus spiralis* na dose de 5 mg/kg em modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina por Amorim, 2017.

Realizou-se um experimento piloto com duração de 28 dias, com os grupos CONTROLE e DOX (n=5) para definição do período experimental e de tratamento. O experimento

propriamente dito teve duração de 21 dias, sendo que os animais dos grupos DOX + LOS, DOX + EAQ e DOX + EHE receberam, respectivamente, administração oral de losartana, EAQ e EHE por 14 dias a partir do 7º dia experimental, ou seja, 7 dias após indução da síndrome nefrótica. No 21º os animais foram submetidos a cintilografia renal e, em seguida, eutanasiados por exsanguinação por meio de punção intracardíaca. Os delineamentos experimentais descritos estão esquematizados na **Figura 11**.

Figura 11 – Delineamento do experimento piloto (A) e do experimento definido (B) para avaliação do efeito de EAQ e EHE em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: DOX: doxorrubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

4.9.3 Análises biométricas

Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas para avaliação diária do consumo hídrico e alimentar, bem como do volume urinário. A massa dos ratos foi determinada diariamente durante todo o período experimental. O balanço hídrico foi calculado pela diferença entre o consumo hídrico e o volume urinário.

4.9.4 Coleta e análise do material biológico

Diariamente determinou-se o volume urinário de cada animal e as amostras de urina foram analisadas por fita de urinálise (Bioclin, Brasil), sendo determinados semi-quantitativamente os seguintes parâmetros: sangue, glicose, cetona, bilirrubina, nitrito, leucócitos, proteinúria, densidade e pH.

Amostras urinárias de 24 horas foram coletadas nos dias experimentais 0, 7, 14, 21 e 28, de acordo com o experimento, para determinações quantitativas de parâmetros de função renal (**Figura 11**). Após a coleta, determinação do volume e análise por fita de urinálise, as amostras foram centrifugadas a 447 g por 5 minutos em centrífuga clínica (Excelsa, Fanem). Alíquotas de 1 a 2 mL foram congeladas a -80 °C até o momento dos ensaios.

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com injeção IP de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e, em seguida, coletadas amostras sanguíneas por punção intracardíaca. O sangue colhido foi centrifugado a 2755 g durante 10 minutos e o soro obtido (2 mL/rato) armazenado em tubos fechados e congelados a -20 °C, para dosagens laboratoriais posteriores.

Após coleta do sangue por punção intracardíaca, realizou-se a exangüinação do animal. Para isso, utilizou-se agulha (0,7 x 25mm) acoplada a uma seringa de 10 mL preenchida com solução de NaCl 0,9% estéril. Introduziu-se a seringa no ventrículo esquerdo do animal, injetando lentamente a solução salina na circulação sistêmica. Cortou-se a veia cava inferior, para a saída

gradativa do sangue. A manobra foi repetida por mais 2 vezes para assegurar a completa lavagem dos órgãos. Em seguida, extraiu-se um rim de cada vez, os quais foram pesados e em seguida acondicionados da seguinte forma:

- os rins esquerdos foram acondicionados em Eppendorf, submetido a congelamento por nitrogênio líquido e depois armazenado à temperatura de -80 °C para ensaios posteriores;
- os rins direitos foram cortados em seção longitudinal e acondicionados em tubos Falcon de 14 mL, contendo formaldeído tamponado 10% para as análises histológicas.

4.9.5 Determinação quantitativa de parâmetros de função renal

Os parâmetros de função renal avaliados quantitativamente foram: depuração de creatinina, osmolalidade sérica e urinária, depuração de água livre, depuração osmolar e a proteinúria. As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM) em colaboração da Dra. Roberta da Silva Filha da Faculdade de Medicina (FM) da UFMG.

4.9.5.1 Determinação da creatinina sérica e urinária

As dosagens de creatinina sérica e urinária foram realizadas por método colorimétrico utilizando kit comercial da Gold Analisa (Brasil). O método baseia-se na reação colorimétrica entre a creatinina e o picrato alcalino, formando um complexo amarelo-avermelhado, o picrato de creatinina. Para realização das análises as amostras de urina foram diluídas 25 vezes e as amostras de plasma 2x com água destilada. Posteriormente 100 µL de cada amostra diluída foi misturada a 1000 µL de uma mistura contendo ácido pícrico (22,2 mmol/L) e tampão (hidróxido de sódio 200 mmol/L) na proporção de 1:4. Utilizou-se como padrão uma solução de creatinina na concentração de 4,0 mg/dL preparada da mesma forma que as amostras e água destilada foi utilizada como branco. As soluções resultantes foram homogeneizadas e lidas em analisador bioquímico semiautomático (modelo BIO-2000 – Bioplus) a λ 510 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de creatinina.

4.9.5.1.1 Determinação da depuração de creatinina

A depuração da creatinina foi determinada utilizando-se os valores de creatinina sérica ou plasmática e volume urinário de 24h, conforme fórmula a seguir:

$$\text{Depuração de creatinina (mL/min)} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dL)}}{\text{creatinina plasmática (mg/dL)}} \times \text{VM (mL)}$$

Sendo VM (volume urinário) = volume urinário de 24 horas, em mL, dividido por 1440.

4.9.5.2 Determinação da proteinúria

Para quantificação da proteinúria empregou-se método colorimétrico, baseado na reação das proteínas presentes na amostra com vermelho de pirrogalol em meio ácido (Kit proteinúria, Gold Analisa, Brasil; Kit proteinúria, Bioclin, Brasil), de acordo com protocolos previamente padronizados (SILVEIRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015). Para realização das análises, 50 µL de cada amostra de urina, 50 µL do padrão (albumina bovina 50 mg/dL) e 50 µL de água deionizada (branco) foram misturadas a 1000 uL do reagente de cor (tampão pH 2,3 vermelho de pirogalol 60 mmol/L, molibdato sódico 40 mmol/L, succinato 50 mmol/L e laurel sulfato de sódio 1 g/L), e então homogeneizadas e incubadas em estufa por 5 minutos a 37 °C. As soluções resultantes foram homogeneizadas e lidas em analisador bioquímico semiautomático (modelo BIO-2000 – Bioplus) a λ 600 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de proteínas. Para cálculo da proteinúria de 24 horas, empregou-se a seguinte equação.

$$\text{Proteinúria (mg/24h)} = \frac{\text{Concentração de proteínas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right) \times \text{Volume urinário de 24 h (mL)}}{100}$$

4.9.5.3 Determinação da osmolaridade sérica e urinária e da depuração osmolar e de água livre

A osmolalidade sérica e urinária foram determinadas pelo método de osmometria de congelamento, com o auxílio do osmômetro (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Alemanha). As amostras de urina (25 µL), diluídas 2 vezes em água destilada (1:2) e as amostras de plasma (25

μL) foram lidas diretamente no equipamento e os resultados obtidos em mOsm/kg . A depuração osmolar (COsm) e a depuração de água livre (CH_2O) foi obtido a partir das equações apresentadas a seguir:

$$\text{COsm} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = \frac{\text{Osmolalidade urinária} \left(\frac{\text{mOsm}}{\text{Kg}} \right) \times \text{Volume urinário (mL)}}{\text{Osmolalidade sérica} \times \text{tempo de coleta da urina (min)}}$$

$$\text{CH}_2\text{O} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = \frac{\text{Volume urinário (mL)}}{\text{tempo de coleta da urina (min)}} - \text{COsm} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)$$

4.9.6 Cintilografia renal com $^{99\text{m}}\text{TC-DMSA}$

Os animais foram submetidos à cintilografia renal com ácido dimercaptosuccínico marcado com pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{TC-DMSA}$) no 21º dia experimental. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Radiofármacos (FAFAR/UFMG) com a colaboração da Prof. Simone Odília Antunes Fernandes (FAFAR/UFMG) e da doutoranda Kátia Duarte Vidal (FAFAR/UFMG).

O ácido dimercaptosuccínico (DMSA), foi radiomarcado com aproximadamente 129 MBq de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) (IPEN, 2015). Os animais foram anestesiados com injeção IP de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e, posteriormente, alíquotas contendo aproximadamente 4 MBq em 0,1 mL de $^{99\text{m}}\text{TC-DMSA}$ foram administradas na veia lateral da cauda com intervalos de 10 minutos cada. Para cálculo da atividade $^{99\text{m}}\text{TC-DMSA}$ administrada calculou-se a diferença da atividade antes da injeção (seringa contendo o radiofármaco) pela atividade após a injeção (atividade residual da seringa após a injeção do radiofármaco). Após a administração, aguardou-se 60 minutos para a aquisição das imagens. Cada animal foi posicionado na câmara gama (Nuclotide™, TH22 Mediso) e o tempo de monitoração foi de 600 segundos, com os seguintes parâmetros de aquisição: Matriz: 256 x 256 x 16; Orientação: 0 °; Colimador LEHR. As imagens obtidas foram processadas utilizando software InterviewXP® Gama-câmera Mediso e quantificou-se a porcentagem de captação de $^{99\text{m}}\text{TC-DMSA}$ pelos rins.

4.9.7 Análises histológicas

Após fixação em formaldeído tamponado, os rins foram conservados em álcool a 70% que foi trocado diariamente até o clareamento do órgão e o processamento histológico. Após inclusão em parafina, os tecidos foram fatiados em cortes de 4 µm e corados pela técnica da hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas em microscopia convencional com auxílio de uma câmera fotográfica digital para registro das imagens. A análise das lâminas foi realizada pelo Dr. Stanley de Almeida Araújo (Hospital das Clínicas/UFGM) e pelo Prof. Dr. Ênio Ferreira (Faculdade de veterinária/UFGM).

4.9.8 Análise estatísticas para dados biométricos, parâmetros de função renal e cintilografia renal com ^{99m}TC-DMSA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism versão 7.0*. Todos os dados foram inicialmente avaliados em relação à presença de *outliers* pelo método de ROUT (Q=1%) e quanto à distribuição pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Confirmada a distribuição normal dos dados, utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA One Way) ou ANOVA two way para medidas repetidas ao longo do tempo, ambas seguidas de pós teste de Tukey. Foram consideradas significativas diferenças com o valor de p inferior a 0,05.

4.9.9 Estudo de metabolômica plasmática

As amostras de plasma coletadas foram submetidas a análise metabólica utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-MS). Esses ensaios foram realizados na Associação Beneficente para o Sangue Coleção (Colsan/SP) com a colaboração do Dr. Mario Augusto Izidoro.

4.9.9.1 Preparo das amostras

Para análise por GC-MS, 50 µL de plasma foi misturado em vórtex com 150 µL de acetonitrila por 2 minutos para garantir a desproteinização, e depois centrifugado por 7 minutos a 10.000 g

a 4 °C em microcentrífuga, 150 µL do sobrenadante foi transferido para vials de GC-MS contendo inserts de vidro. O solvente foi evaporado utilizando speed vácuo Savant™ SPD131DDA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EUA) a 30 °C. Para a metoximação, 20 µL de cloridrato de O-metoxiamina (Merck - Sigma-Aldrich em piridina (15 mg/mL) foi adicionado a vial e submetido a agitação em vórtex por 1 minuto. Em seguida, os vials foram cobertos de papel alumínio e incubados, protegidos da luz à temperatura ambiente durante 16 horas. Decorrido este período, adicionou-se 10 µL de bis-(trimeltisilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% v/v de tetrametilsilano (TMS) (Merck - Sigma-Aldrich). As amostras foram submetidas a agitação por vortex por 30 segundos e incubadas a 70 °C durante 1h para reação de sililação, e então, resfriadas por cerca de 30 minutos protegidas da luz. No final do procedimento, 100 µL de solução do padrão interno ácido pentadecanoico (C18:0) (10 mg/mL em heptano) foram adicionados ao vials de CG contendo as amostras. Três amostras branco foram preparadas seguindo o mesmo procedimento. Essas amostras branco, foram utilizadas no início, no meio e no final da sequência de análises. Adicionalmente, amostra de Controles de Qualidade (CQs) foram preparados misturando-se 50 µL de cada amostra e submetendo-as aos mesmos procedimentos de extração e derivatização de metabólitos que as outras amostras da sequência e analisadas nas mesmas condições cromatográficas.

4.9.9.2 Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas por GC-MS (GCMS-QP2020 NX), do Sistema LC Shimadzu Prominence (Kyoto, Japão). Utilizou-se a coluna DB5-MS (30 m x 0,25mm, 0,25µm, Restek). Cada amostra (1 µL) foi injetada em modo splitless com fluxo de gás Hélio de 20 ml/min, empregado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,36 ml/minuto. A temperatura da coluna foi inicialmente mantida a 80 °C e gradualmente aumentada a uma taxa de 15°C/min até a temperatura final de 300 °C, que foi mantida por 8 minutos, antes do resfriamento. O injetor, a linha de transferência, o filamento de origem e a temperatura quadrupolar foram mantidos em 280, 200, 150 e 150 °C, respectivamente. O sistema foi operado em modo de varredura completa (m/z 50-600) a uma taxa de 3 espectros/s, e com fonte ionização de elétrons (EI) ajustada em 70 eV. Em seguida, foi aplicado um método de tempo de retenção bloqueado (RTL) para reduzir a variação do tempo de retenção (RT) de toda a análise. O controle de instrumentos, aquisição

de dados e processamento de dados foram realizados por Software LabSolutions (GCMS versão 4.5, Shimadzu Co., Japão) para controle em tempo real de cada amostra.

4.9.9.3 Identificação e quantificação dos metabólitos detectados

Os metabólitos detectados foram processados para análises em modo Scan com o objetivo de criar uma matriz unificada de variáveis com diferentes estados de carga, adutos e grupos de analitos em todas as amostras. Para isto, foram utilizados os softwares GCMS Solution (v.3.30), NIST 17 MASS (v.1.00.1) e GC-MS Smart Metabolite (v.3.01), todos desenvolvidos pela Shimadzu Co. O software foi configurado da forma mais eficiente possível para processar todos os picos detectados, separando-os do ruído do equipamento. A base de dados pública *The Human Metabolome Database* (HMDB) foi utilizada para avaliar os espectros detectados no modo Scan (WISHART *et al.*, 2018).

4.9.9.4 Garantia da qualidade dos dados

Os dados brutos de todas as amostras foram processados como descrito acima e a qualidade dos dados foi assegurada pelo uso das amostras de CQ. Os metabólitos identificados em todas as amostras de CQ e cujo coeficiente de variação foi inferior a 30% foram mantidos no estudo de metabolômica.

4.9.9.5 Análise estatística

Realizou-se análise estatística uni e multivariada para os dados obtidos na plataforma Metaboanalista 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). A análise multivariada utilizou modelo não supervisionado, por método de análise dos componentes principais (PCA) a fim de confirmar a qualidade dos dados, detectar *outliers* e tendências, verificar a qualidade da amostra e analisar a separação entre os grupos. Adicionalmente, modelo supervisionado, utilizando regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS) foi usada para confirmar a separação entre os grupos. Para análise univariada, dados paramétricos foram analisados por ANOVA seguido de

pós-teste de Tukey. Foram consideradas significativas diferenças com valor de p e *False Rate Discovery* (FDR) inferiores a 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da droga vegetal de *Costus spiralis*

O controle de qualidade de matérias-primas vegetais é muito importante para o desenvolvimento e produção de fitoterápicos, tanto em contexto de pesquisa quanto para o setor farmacêutico, sendo um desafio no Brasil, conforme discutido no item 2.4. Embora o país disponha de uma das maiores biodiversidades mundiais, ainda há grande dependência estrangeira em relação à obtenção de IFAV, sobretudo de países como China e Índia. Uma maior independência do país nesse caso exige a condução de estudos que possibilitem a padronização dos processos de obtenção de fitoterápicos e seu controle de qualidade desde a matéria prima vegetal até o produto final (HENRIQUE *et al.*, 2014; NASCIMENTO; MALDONADO; ARNÓBIO, 2015; SINGH *et al.*, 2022).

Dessa forma, uma preocupação neste trabalho foi realizar ensaios de caracterização da droga vegetal, assim como dos derivados obtidos. Foram realizados testes simples, porém necessários, visto que atualmente não há monografia farmacopeica para a droga vegetal de *Costus spiralis*, embora ela seja amplamente utilizada no país. Os testes incluíram a determinação da perda por dessecação, importante parâmetro para segurança microbiológica e do índice de espuma, geralmente empregado para drogas vegetais ricas em saponinas (ANVISA, 2014c; ANVISA, 2019a; SIMÕES *et al.*, 2017). Adicionalmente, determinou-se a presença e teor de flavonoides. Os resultados obtidos na caracterização da droga vegetal estão resumidos na **Tabela 5**.

A perda por dessecação e o índice de espuma, em geral, são testes de integridade e pureza preconizados em compêndios oficiais para controle de qualidade de drogas e derivados vegetais, juntamente à determinação de cinzas, contaminação microbiológica, pesquisa por agrotóxicos e metais pesados, entre outros. Na Farmacopeia Brasileira, em geral, as especificações para o teste de perda por dessecação variam entre 7% e 14%, valores usualmente encontrados para os diferentes órgãos de plantas secas. O resultado para a droga vegetal de *Costus spiralis* utilizada no presente estudo foi coerente com essa faixa (**Tabela 5**). Este teste, em geral, é uma aproximação do teor de umidade, sendo um importante parâmetro de qualidade, já que altos teores de água podem resultar em contaminação microbiológica e degradação do

IFAV. O índice de espuma, por sua vez, foi determinado devido aos relatos na literatura da presença de saponinas na espécie (AMORIM, 2013; DA SILVA; PARENTE, 2004; GARCIA, 2011). Porém, o índice obtido foi baixo, sugerindo a ausência ou o baixo teor destas substâncias na droga vegetal (ANVISA, 2019a).

Tabela 5 – Resultados obtidos para caracterização físico-química da droga vegetal de *Costus spiralis*

Teste	Resultado
Perda por dessecação	8,34%
Índice de espuma	< 100
Teste de Identificação por CLUE e CDD	Positivo
Teor de Vicenina-2	0,055 ± 0,002%
Teor de Escafosídeo	0,076 ± 0,002%
Teor de Flavonas C-glicosiladas calculadas como escafosídeo	0,344 ± 0,012%

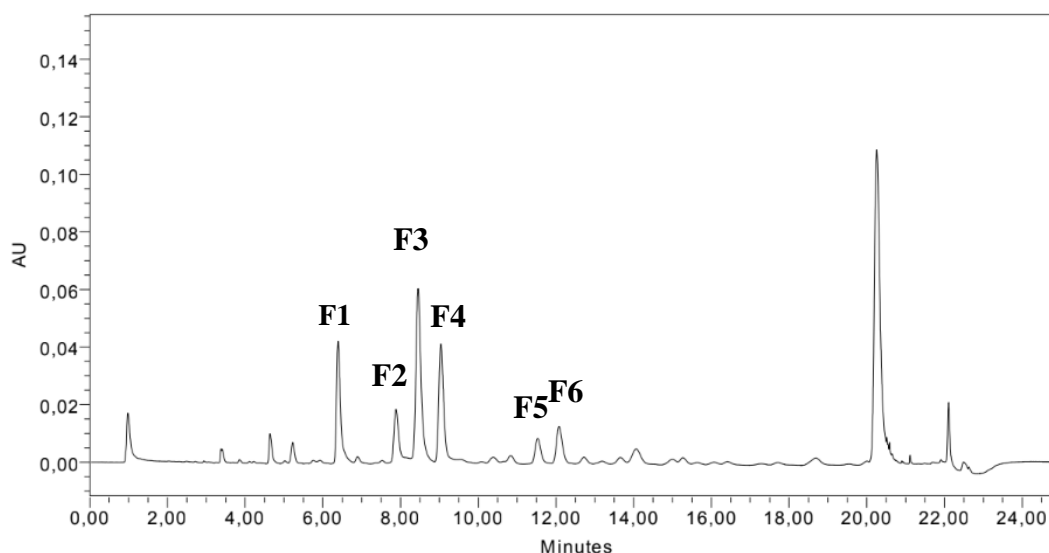
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Além dos testes de integridade e pureza, preconiza-se a realização da identificação botânica, além de testes para determinação qualitativa e quantitativa de marcadores da espécie (ANVISA, 2014c; ANVISA, 2019a). Relatos da literatura e resultados anteriores obtidos analisando-se amostra coletada no mesmo local, demonstram de forma consistente a presença de flavonoides na espécie e seu potencial como marcadores para *Costus spiralis*, conforme apresentado na revisão bibliográfica do presente estudo (AMORIM *et al.*, 2022; ANTUNES; DA SILVA; PARENTE, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2018; GARCIA, 2011).

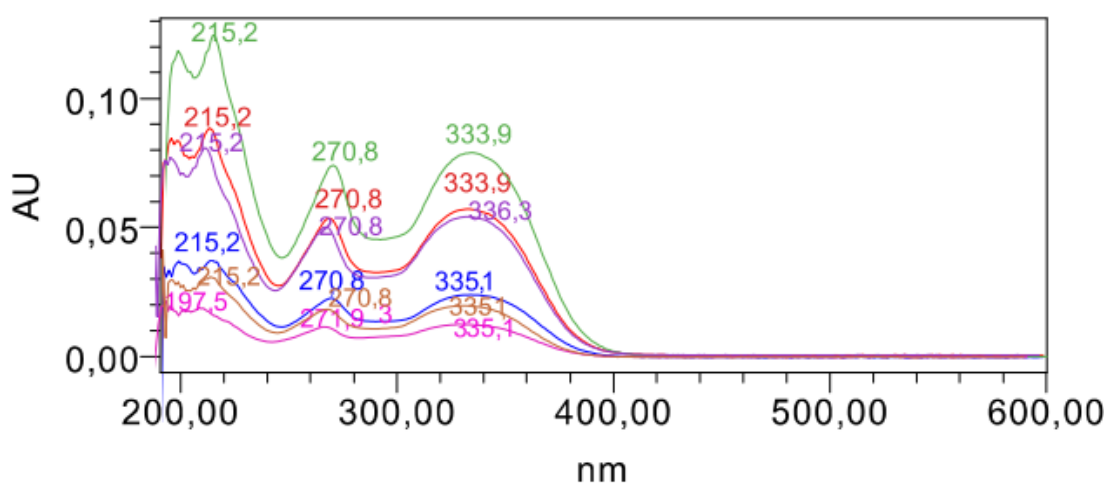
O perfil cromatográfico obtido por CLUE-DAD/UV para droga vegetal de *C. spiralis*, apresentado na **Figura 12** evidencia a presença de flavonoides. Destaca-se que essas substâncias foram previamente identificadas em trabalho anterior, como flavonas C-glicosiladas da apigenina, sendo F1 e F4, relativas a vicenina-2 e escafosídeo, respectivamente e F2, F3, F5 e F6 a isômeros do escafosídeo com estruturas compatíveis às apresentadas na **Figura 4** (AMORIM, 2017; AMORIM *et al.* 2022).

Figura 12 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD-UV para folhas de *Costus spiralis* e espectros de UV dos picos referentes a flavonas C-glicosiladas da apigenina

A



B



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Cromatograma obtido para a droga vegetal de *Costus spiralis* em λ 335 nm (A) e sobreposição do espectro de UV (B) dos picos F1-F6. F1 = vicenina-2; F4= escafósídeo; F2, F3, F5, F6 = isômeros do escafósídeo. Condições cromatográficas: vide Material e métodos, item 4.3.3.

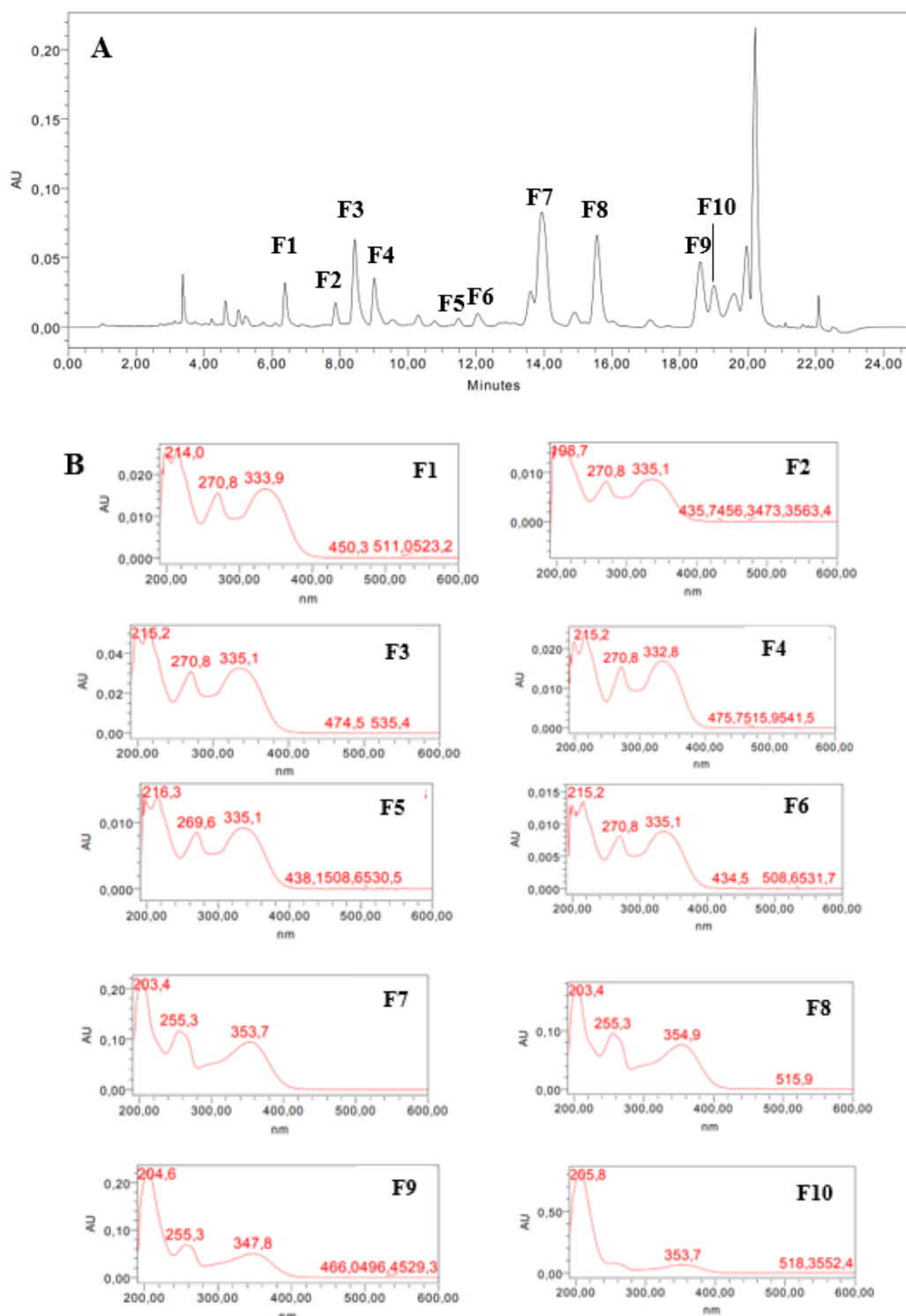
O perfil cromatográfico obtido foi considerado adequado para a utilização em método de identificação da droga vegetal de *Costus spiralis*. A capacidade de métodos de identificação em distinguir espécies semelhantes é o principal requisito para validação de um método analítico para identificação de drogas e derivados vegetais, comprovando sua seletividade, conforme preconizado pela RDC nº 166 de 2017. Consideram-se espécies semelhantes àquelas que

apresentam composição química similar ou que são morfologicamente parecidas a espécie de interesse, e, idealmente, podem estar presentes como adulterantes (ANVISA, 2014b, 2017).

Costus spicatus se enquadra na categoria de espécie “semelhante” a *Costus spiralis*, já que os dados da literatura sugerem uma composição química similar mas, principalmente devido a semelhança botânica e o uso indiscriminado pela população das duas espécies, conforme discutido no item de 2.1.11. Portanto, *C. spicatus* foi selecionada para avaliação da seletividade do método proposto. O perfil obtido está apresentado na **Figura 13** e na **Figura 14** é possível visualizar a sobreposição dos cromatogramas obtidos para as duas espécies. Observa-se a presença de picos com os mesmos tempos de retenção que aqueles observados para F1, F2, F3, F4, F5 e F6 com espectros de UV semelhantes, confirmando a semelhança na composição química das espécies. Ao mesmo tempo, verifica-se a presença de picos intensos entre 13 e 20 minutos no cromatograma obtido para *C. spicatus*, os quais não estão presentes em *C. spiralis* (**Figura 14**). Os picos têm perfil característico de flavonoides, mas provavelmente, são derivados de outras agliconas que não a apigenina (**Figura 13**) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Dessa forma, a aplicação do método de identificação proposto é capaz de diferenciar as duas espécies.

Para validação de métodos de identificação, preconiza-se ainda, se aplicável, a avaliação da robustez, ou seja, a capacidade do método de atender às especificações propostas mediante pequenas e deliberadas alterações nas condições de análise e na estabilidade das soluções analisadas (ANVISA, 2014b, 2017). Verificou-se que o perfil cromatográfico se manteve semelhante em todas as condições avaliadas, satisfazendo as especificações sugeridas. As soluções amostra e padrão mantiveram-se estáveis por 48 horas, sem alterações significativas do perfil cromatográfico.

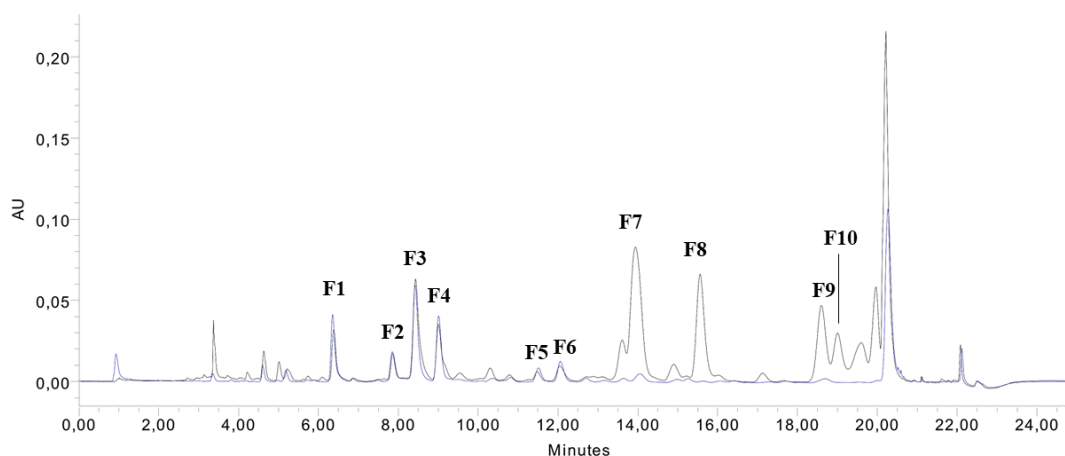
Figura 13 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD/UV para folhas de *Costus spicatus* e espectros de UV dos picos F1-F10



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: A = Cromatogramas obtidos para a droga vegetal de *Costus spicatus* em λ 335 nm; B = espectros de UV dos picos assinalados nos cromatogramas. Condições cromatográficas: vide Material e métodos, item 4.3.3. Picos com os mesmos TRR aos obtidos para o método de identificação proposto para *Costus spiralis* foram identificados com os mesmos códigos.

Figura 14 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLUE-DAD/UV para folhas de *Costus spicatus* e *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

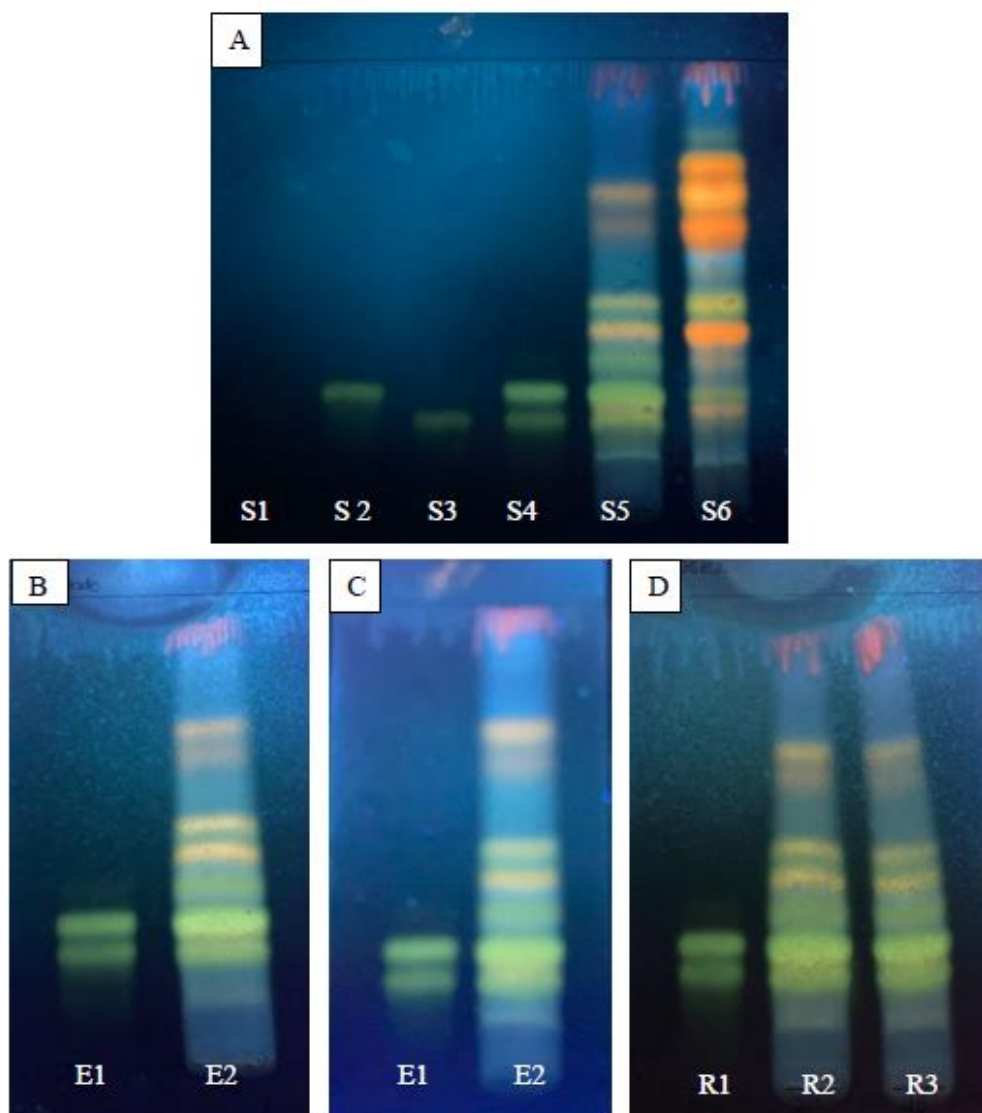
Nota: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a droga vegetal de *Costus spiralis* (azul) e *Costus spicatus* (preto) em λ 335 nm. F1 = vicenina-2; F4= escafósídeo; F2, F3, F5, F6 = isômeros do escafósídeo; F7-F10 = flavonoides não identificados. Condições cromatográficas: vide Material e métodos, item 4.3.3

O método proposto, portanto, foi validado conforme preconizado pela legislação vigente. Sugere-se o emprego do método descrito como teste de identificação da droga vegetal de *Costus spiralis*, estabelecendo como especificações a presença dos picos de F1 (vicenina-2), F2, F3, F4 (escafósídeo), F5 e F6, identificados pelos TRR em relação ao padrão de referência de escafósídeo, com resolução e assimetria adequados, além da ausência de picos intensos na região entre os TRR 1,4 e 2,30 (aproximadamente 13 e 20 minutos), conforme descrito no item 4.3.3. No caso de equipamentos com detectores DAD é possível ainda definir como critério para aprovação a semelhança espectral dos picos requeridos com aqueles obtidos para os padrões de vicenina-2 e escafósídeo. A presença de flavonas glicosiladas derivadas da apigenina também foi descrita por Moreno e colaboradores (2021) em frações obtidas a partir de decocto das folhas de *Costus spicatus*.

Os métodos de identificação farmacopeicos por CLAE ou CLUE-UV/DAD, no entanto, não são comuns, devido à instrumentação e complexidade da técnica. Por isso, foi desenvolvido e validado um segundo método com o mesmo objetivo, mas utilizando CCD, uma técnica amplamente utilizada para essa finalidade, que apresenta baixo custo, rapidez e facilidade na execução. Os mesmos parâmetros de validação foram avaliados, ou seja, seletividade, robustez

e estabilidade de soluções. A **Figura 15** apresenta as cromatoplasmas obtidas para avaliação de cada um deles.

Figura 15 – Cromatoplasmas obtidos para validação de método para identificação da droga vegetal de *Costus spiralis* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: A = Cromatogramas obtidos para avaliação da seletividade (A), estabilidade de solução, sendo perfil inicial (B) e após 48 h do preparo das amostras (C) e robustez (D). Soluções avaliadas na seletividade: S1 = diluente; S2: Solução padrão de escafosídeo; S3 = Solução padrão de vicenina; S4 = solução de referência; S5 = solução amostra de *C. spiralis*; S6 = solução amostra de *C. spicatus*. Soluções avaliadas na estabilidade de soluções: E1 = solução de referência; E2 = solução amostra de *C. spiralis*. Soluções avaliadas na robustez: R1 = Solução de referência; R2 = solução amostra com tempo de extração = 20 min; R3 = solução amostra com tempo de extração = 15 min. Condições cromatográficas e preparo das amostras: fase móvel: acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (10:1.1:1.1:2.5); fase estacionária: sílica-gel G/UV254; revelador: solução de difenilborato de aminoetanol; detecção: λ 365 nm. Mais informações: vide Materiais e métodos, item 4.3.3.4.

Observa-se que é possível diferenciar as duas espécies avaliadas pelos perfis cromatográficos obtidos, evidenciando a seletividade do método. Na robustez, avaliou-se a influência do tempo de extração da amostra, e o método mostrou-se robusto. As soluções de análise também foram estáveis por 48 horas.

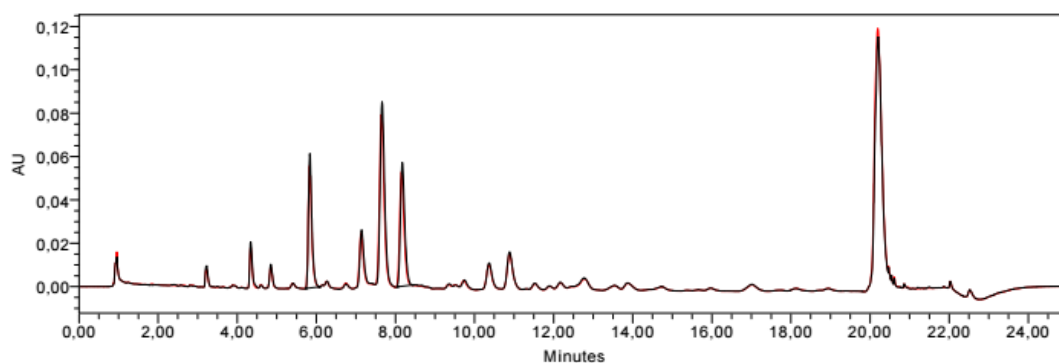
Ambos os métodos propostos para análise da droga vegetal de *C. spiralis* podem ser utilizados para identificação da espécie, conjuntamente ou de forma isolada. Naturalmente, para que ele seja empregado de forma mais ampla, faz-se necessária a análise de um número representativo de amostras de *Costus spiralis*, com condições de cultivo e processamento distintos, e idealmente que outras espécies semelhantes sejam avaliadas, em um processo de validação interlaboratorial, a fim de confirmar a reprodutibilidade do método (AOAC, 2019). Nas condições avaliadas, os métodos são úteis para confirmar o perfil químico de amostras coletadas no mesmo local em datas distintas, e o seu desenvolvimento e validação é altamente relevante uma vez que pode contribuir para a elaboração de uma futura monografia farmacopeica para a espécie.

5.2 Obtenção de extratos das folhas de *Costus spiralis* ricos em flavonoides

Para obtenção de EHE empregou-se método extrativo desenvolvido anteriormente por Amorim (2017). Tal método utiliza maceração assistida por ultrassom, uma das técnicas que tem se mostrado mais eficientes para extração de polifenóis, incluindo os flavonoides (ADJÉ *et al.*, 2010; ANDERSEN; MARKHAM, 2006; SAFDAR *et al.*, 2016).

Na **Figura 16**, é possível observar a semelhança entre os perfis cromatográficos obtidos para droga vegetal e EHE nas mesmas condições cromatográficas. Os métodos analíticos empregados foram desenvolvidos de modo a manter a concentração de trabalho dos flavonoides para as duas amostras, porém, o extrato apresentou um aumento do teor de flavonoides em mais de 7 vezes (AMORIM, 2017).

Figura 16 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD-UV para folhas e para o extrato hidroetanólico (EHE) de *Costus spiralis*

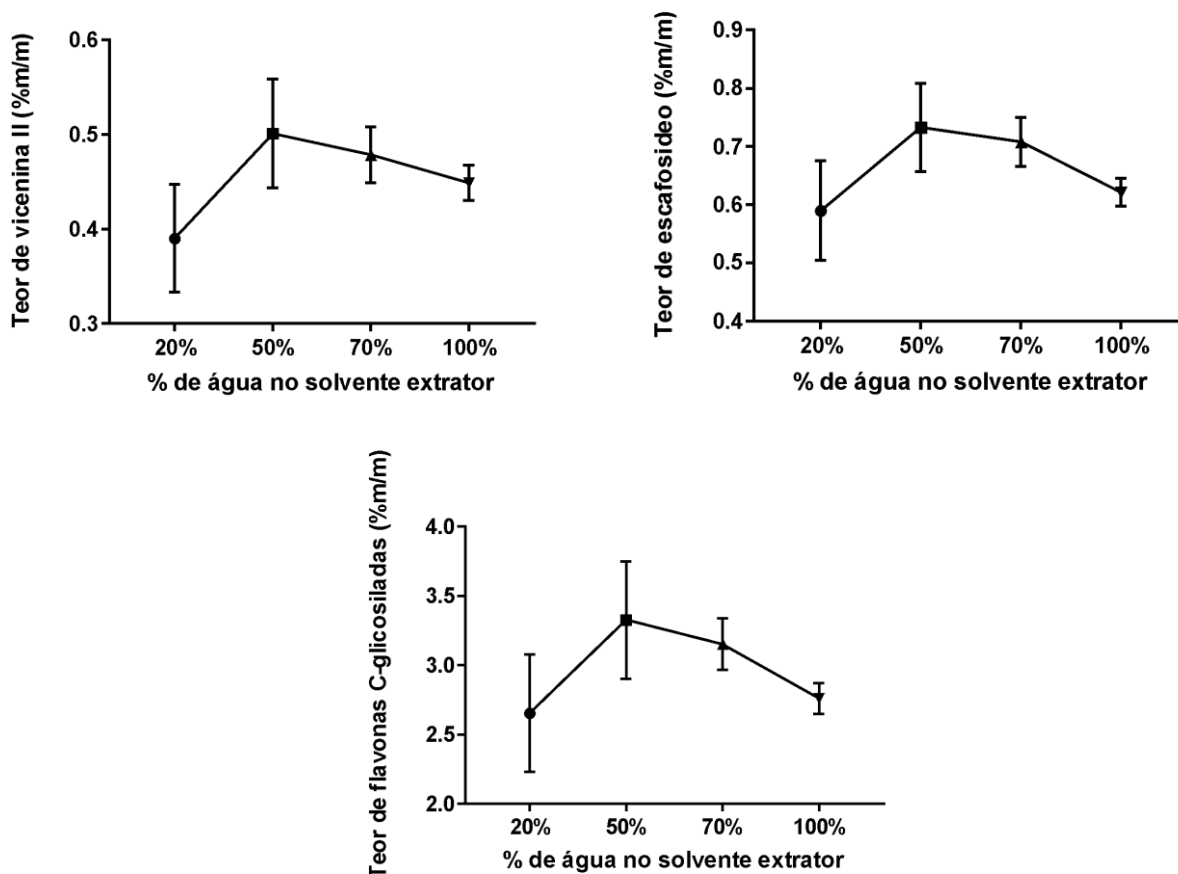


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: sobreposição dos cromatogramas obtidos para as folhas secas de *Costus spiralis* (linha preta) e para o extrato hidroetanólico 80% (EHE) (linha vermelha). Condições cromatográficas: vide Material e métodos (item 4.3.3.3).

Amorim (2017) verificou que soluções hidroetanólicas foram mais eficientes para extração dos flavonoides em comparação ao etanol puro, sendo necessário, no mínimo, 20% de água. No entanto, não se chegou a uma conclusão sobre a melhor proporção entre os dois solventes, definindo-se como solvente extrator, solução hidroetanólica a 80% devido a maior facilidade de eliminação do solvente (AMORIM, 2017). Dessa forma, para otimizar o método desenvolvido anteriormente, foram avaliadas no presente estudo misturas de etanol e água nas proporções 80:20 50:50, 30:70 e água fervente e os extratos resultantes foram denominados EHE, EHE50%, EHE30% e EAQ, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os teores de flavonas C-glicosadas, escafosídeo e vicenina-2 nos extratos avaliados. Observa-se que os valores de desvio padrão entre as triplicatas foram altos, o que pode justificar a ausência de diferença estatística (**Figura 17**). No entanto, é importante ressaltar que o desvio padrão relativo (DPR) entre amostras obtidas para cada solvente foi inferior a 15% para todos os extratos avaliados, sendo, portanto, inferior aos limites de variação estabelecidos para os dois tipos de marcadores preconizados pela Anvisa, a saber, 15% para marcadores ativos e 20% para marcadores analíticos (ANVISA, 2014a).

Figura 17 – Teores de vicenina-2, escafósídeo e flavonas C-glicosiladas totais calculadas como escafósídeo para os extratos de *Costus spiralis* obtidos utilizando diferentes solventes hidroetanólicos e água



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste ANOVA One Way seguido de pós teste de tukey (n=3). Não foi observada diferença estatística entre os dados. Os solventes extratores compreenderam soluções hidroetanólicas em diferentes proporções e água pura. Os solventes extratores com 20%, 50% e 70% de água em etanol e a solução 100% aquosa, resultaram, respectivamente, nos extratos EHE, EHE50%, EHE 30% e EAQ.

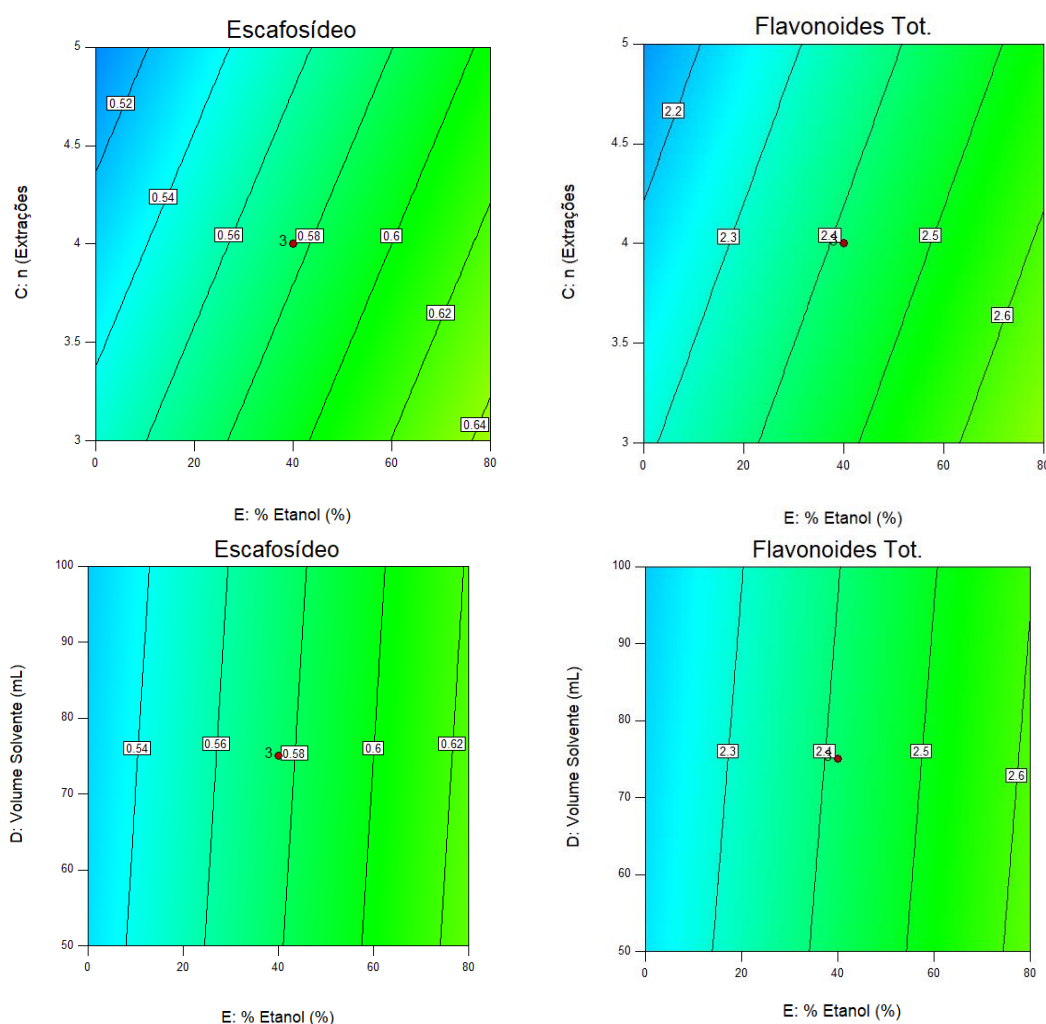
Considerando os resultados obtidos, empregou-se planejamento experimental a fim de estudar mais detalhadamente as variáveis que poderiam impactar significativamente no processo extrativo e suas correlações, uma das vantagens do uso dessa ferramenta. De forma simplificada, ao utilizar o planejamento de experimento, avalia-se o efeito de alterações sistemáticas e intencionais de variáveis experimentais selecionadas nas respostas esperadas de forma conjunta. Em processos tradicionais em que se altera uma variável a cada experimento, como realizado inicialmente para avaliação da proporção de etanol no solvente extrator, caso exista correlação entre variáveis deste processo, dificilmente a otimização do método é

alcançada (BARROS NETO; SCAMINIO; BRUNS, 2010; CARVALHO *et al.*, 2018; POLITIS *et al.*, 2017).

Foram avaliadas cinco variáveis que poderiam impactar na extração de flavonoides: a proporção de água e etanol e volume do solvente extrator, tempo e temperaturas de extração em ultrassom e o número de repetições do processo de extrativo. Como resultado os modelos matemáticos calculados com os dados obtidos foram considerados significativos e não foi observada nenhuma falta de ajuste para qualquer resultado medido. Apenas a proporção de etanol empregado no solvente, o número de extrações e o volume do solvente foram significativos para a extração de escafósídeos e flavonas C-glicosiladas totais. Nenhum fator foi considerado significativo para a extração de vicenina-2.

Observou-se que uma porcentagem maior de etanol na mistura do solvente (80%) leva a uma melhor extração do escafósídeo e de flavonóides totais. Além disso, o uso de volumes de solvente maiores que 50 mL e número de repetições de extração superior a 3 resultam em menor concentração dessa classe de metabólitos (**Figura 18**). Esse resultado é possivelmente justificado pelo fato de que as condições citadas já promoveram saturação da extração dos flavonoides. O aumento adicional do volume e dos ciclos de extrações pode levar, portanto, a maior extração de outras substâncias e uma menor concentração dos metabólitos de interesse no extrato obtido.

Figura 18 – Superfícies de respostas obtidas para o planejamento fatorial fracionário utilizado na otimização do processo extrativo de folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: os gráficos de superfícies de respostas obtidos indicam que, dentro das faixas avaliadas, o aumento da proporção de etanol, o aumento dos ciclos de extração e do volume de solvente extrator levam a melhor extração dos flavonoides presentes na droga vegetal de *Costus spiralis*.

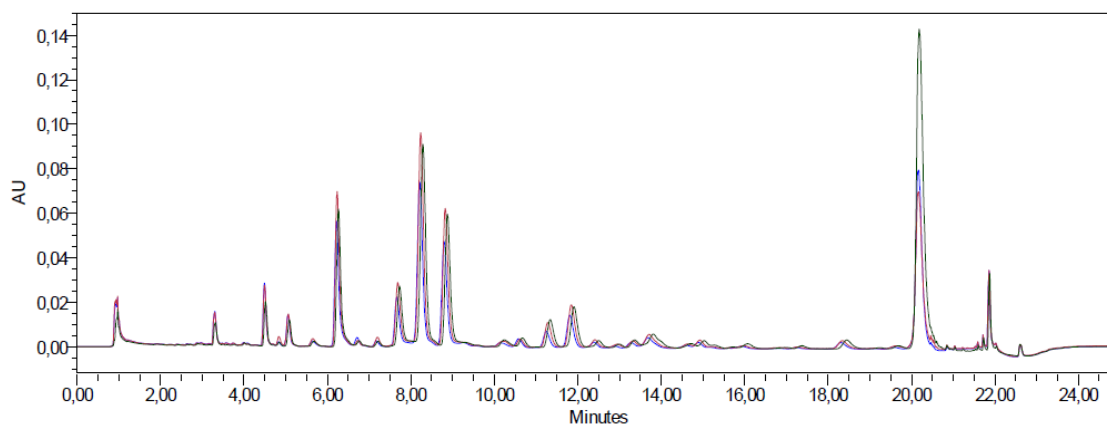
Ao mesmo tempo, todos os pontos avaliados no planejamento experimental atenderam ao espaço ótimo para o teor dos marcadores avaliados. Foi proposta uma variação de $\pm 15\%$ em relação aos resultados obtidos com o método original, utilizando solução hidroetanólica a 80%, 3 ciclos extrativos e 100 mL de solvente extrator para cada ciclo. Nessas condições, obteve-se um teor de flavonas C-glicosiladas totais de 2,512%, sendo 0,417% de vicenina-2 e 0,560% de escafosídeo (**Quadro 2**). Esse extrato mostrou-se capaz de recuperar a função renal de ratos em modelo de nefrotoxicidade induzida por doxorrubicina (AMORIM, 2017). Uma opção, portanto, seria reduzir o volume de solvente, o que pode ser mais adequado levando em

consideração a química verde e o meio ambiente. Por outro lado, como o efeito na concentração de flavonoides foi relativamente pequeno, optou-se por manter o método extrativo anteriormente proposto e selecionar EHE e EAQ para serem avaliados nos ensaios biológicos propostos no presente estudo.

A escolha de EHE baseou-se na possibilidade de comparar os resultados obtidos no presente estudo com aqueles obtidos anteriormente. Ao manter o processo extrativo, espera-se reproduzir o fitocomplexo obtido anteriormente (AMORIM, 2017; AMORIM *et al.*, 2022). Já a seleção de EAQ baseou-se na possibilidade de investigar outros marcadores ativos para a espécie e preparações mais semelhantes às utilizadas pela população.

Ao avaliar os diferentes derivados obtidos por CLUE e comparar os perfis cromatográficos (**Figura 19**) obtidos, é possível observar a grande semelhança entre EHE e EAQ, sendo que a principal diferença seria o pico com tempo de retenção por volta de 20 minutos. Esse pico é composto por substâncias de menor polaridade, sendo o único que varia consideravelmente quando se compara os extratos obtidos com os diferentes solventes extratores. A área desse pico é máxima para EHE e atinge o valor mínimo no cromatograma do EAQ. Em trabalhos anteriores, identificou-se que, além dos flavonoides, as folhas de *Costus spiralis* apresentam em sua composição uma quantidade significativa de ácidos graxos e terpenos, dentre os quais foi possível identificar o ácido ursólico por CCD e por CG-EM (AMORIM, 2013). Sendo assim, provavelmente, esse pico reúne algumas substâncias terpenoidicas que apresentam absorção no UV, além de agliconas de substâncias fenólicas.

Figura 19 – Cromatogramas obtidos para EAQ, EHE e decocto das folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

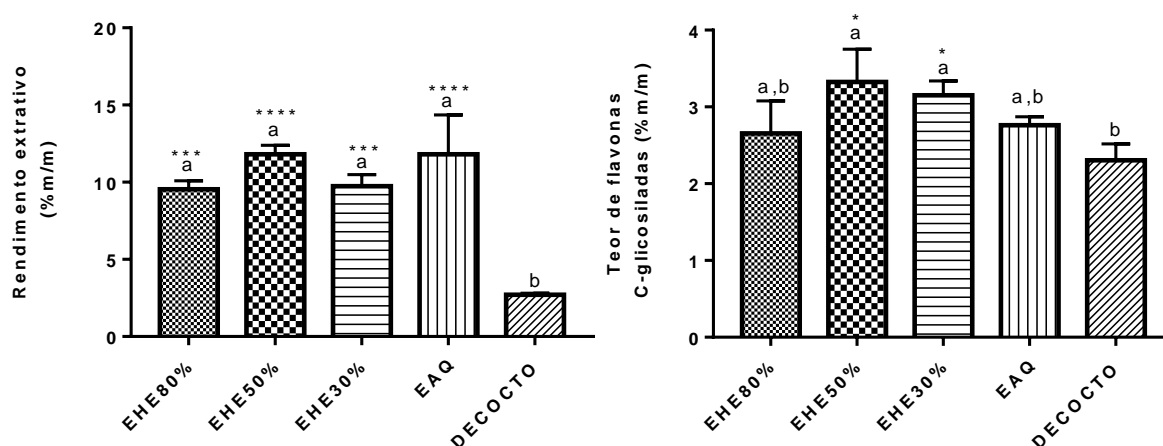
Nota: Sobreposição dos cromatogramas obtidos em λ 335 nm para EHE (linha verde) ; EAQ (linha vermelha) e decocto (linha verde). Condições cromatográficas: vide Material e Métodos, item 4.3.3.3.

Dessa forma, EAQ seria o derivado vegetal cuja composição química apresenta maior variação em relação a EHE, com uma menor concentração de substâncias de menor polaridade. Além disso, o extrato aquoso seria um preparo próximo ao uso popular, no qual é comum o uso de chás das folhas. A fim de avaliar essa semelhança, decidiu-se avaliar o perfil cromatográfico de um derivado vegetal obtido por processo de decocção, um dos métodos extrativos tradicionais relatado para uso popular (LORENZI; MATOS, 2021). O perfil do decocto obtido também pode ser visualizado na **Figura 19**, evidenciando sua semelhança com perfis de EHE e EAQ, com destaque para o último, em que se observa menor quantidade de substâncias de baixa polaridade, conforme esperado.

Na **Figura 20**, são apresentados o rendimento extrativo e o teor de flavonas *C*-glicolisadas calculadas como escafósídeo do decocto e demais extratos obtidos. O rendimento extrativo do decocto foi significativamente menor que os dos demais extratos, porém o teor de flavonoides totais foi comparável. Ressalta-se que, para obtenção do decocto foram utilizados aproximadamente 15 g de droga vegetal para 100 mL de água, ou seja, 3 vezes mais que a quantidade utilizada para obtenção dos outros derivados vegetais avaliados. O preparo foi planejado de acordo com relatos do uso popular na literatura (SAAD *et al.*, 2021). A diferença na razão droga vegetal/solvente extrator pode comprometer a comparação entre o decocto e os demais derivados vegetais obtidos. Ainda assim, embora exista uma diferença evidente nos

rendimentos extrativos, é possível afirmar que a composição química em termos de flavonas C-glicosiladas do decocto se aproxima a dos demais extratos. Segundo a literatura, os decoctos ou infusos de cana do brejo são preparados utilizando 5 a 50% m/v de droga vegetal e são ingeridos de 20 a 250 mL de chá por dia, o que resultaria em uma quantidade relevante de extrato e flavonoides administrados diariamente (LORENZI; MATOS, 2021; SAAD *et al.*, 2021).

Figura 20 – Rendimento extrativo e teores de flavonas C-glicosiladas totais, calculadas como escafósídeo para os extratos utilizando diferentes solventes extratores e o decocto obtidos das folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste ANOVA One Way seguido de pós-teste de tukey (n=3). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$.

A semelhança entre o teor de marcadores e perfis cromatográficos dos extratos obtidos e de derivado vegetal de uso popular, nesse caso o decocto, pode facilitar a obtenção de um produto fitoterápico para o tratamento de doenças renais a partir deste. Atualmente no Brasil é possível registrar um fitoterápico com base na tradicionalidade de uso, como Produto Tradicional Fitoterápico (PTF), sem a necessidade de realização de estudos de eficácia e segurança. A RDC n. 26 de 2014, nesses casos, exige a elaboração de um dossiê técnico que evidencie uso tradicional superior a 30 anos, mostrando que existem dados de uso seguro efetivo suficientes para seu registro como PTF (ANVISA, 2014a).

Existem relatos de que *Costus spiralis* era utilizada por indígenas no século XVII, tendo seu uso popular para doenças renais descrito em várias publicações da década de 80 (DATAPLAMT, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). Dessa forma, a constatação de que os extratos obtidos, especialmente EAQ, apresentam composição química similar às formulações utilizadas popularmente pode constituir um argumento para alegação da tradicionalidade de uso, o que, associada aos estudos que estão sendo conduzidos para os derivados vegetais obtidos no presente estudo, pode facilitar a aprovação de futuras etapas de estudos clínicos, ou mesmo o registro de um novo fitoterápico.

Toda a discussão apresentada acima justifica a seleção de EHE e de EAQ para a realização dos ensaios pré-clínicos de segurança e eficácia em doença renal crônica. Em resumo, a avaliação dos dois extratos pode fornecer informações sobre a eficácia do uso tradicional pela avaliação de EAQ, além de auxiliar na compreensão de quais metabólitos secundários presentes nos extratos são responsáveis pela suposta atividade na função renal. Na teoria, considerando que ambos os derivados selecionados apresentam teores semelhantes de flavonoides, será possível avaliar se esses metabólitos estão envolvidos, e se outras substâncias também podem estar relacionadas ao efeito terapêutico estudado. A fim de permitir uma melhor comparação entre os extratos, outros ensaios de caracterização físico-química foram realizados para ambos.

Para a condução das análises biológicas e demais análises físico-químicas, várias extrações utilizando os solventes extratores selecionados foram realizadas, conforme descrito no item 4.4.1 utilizando água fervente e solução hidroetanólica 80% como solventes extratores, a fim de acumular massa de EAQ e EHE, respectivamente. Os extratos obtidos foram reunidos, levando-se em consideração os perfis cromatográficos e os teores de flavonas C-glicosiladas. Os derivados vegetais finais foram identificados como EHEL1/2019 e EAQ%L1/2019, com massa de aproximadamente 10 g e foram submetidos a caracterização físico-química conforme apresentado a seguir.

5.3 Caracterização química de extratos das folhas de *Costus spiralis*

EHEL1/2019 e EAQ%L1/2019 foram submetidos a testes de perda por dessecação e índice de espuma, prospecção fitoquímica para identificação de classes de metabólitos secundários já relatados para espécie na literatura científica, quantificação de flavonoides, taninos e carboidratos. Os resultados obtidos para os dois extratos encontram-se resumidos na **Tabela 6**, já os seus perfis cromatográficos podem ser visualizados na **Figura 19**. Os dois extratos serão denominados a partir deste ponto apenas como EHE e EAQ para simplificar a apresentação e discussão dos resultados.

Em relação aos testes de pureza, segundo a Farmacopeia Brasileira, extratos secos, em geral, apresentam teor de umidade de até 5%. Os valores obtidos para EHE e EAQ foram superiores, o que provavelmente está relacionado às limitações nos processos de secagem empregados, além de não terem sido adicionadas substâncias inertes como é feito usualmente em extratos comerciais. O índice de espuma, assim como obtido para a droga vegetal foi inferior a 100 evidenciando que os derivados não apresentam teores significativos de saponinas (ANVISA, 2019).

Tabela 6 – Resultados de caracterização química para os extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) de *Costus spiralis*

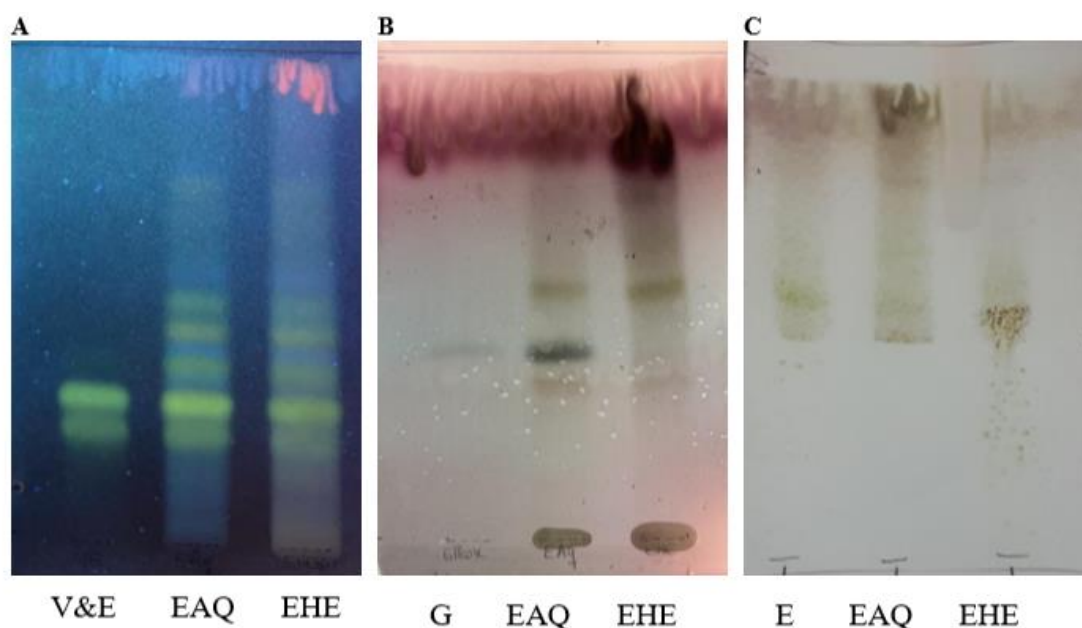
Teste	EHE	EAQ
Perda por dessecação	5,51%	11,04%
Índice de espuma	< 100	< 100
Identificação de flavonoides	Positivo	Positivo
Identificação de taninos (CCD)	Negativo	Negativo
Identificação de carboidratos (CCD)	Positivo	Positivo
Identificação de saponinas (CDD)	Positivo	Positivo
Identificação de triterpenos e esteroides (CDD)	Negativo	Negativo
Teor de Vicenina-2 (CLUE)	0,38 ± 0,02 ^a	0,40 ± 0,01 ^a
Teor de Escafósídeo (CLUE)	0,57 ± 0,04 ^a	0,57 ± 0,01 ^a
Teor de Flavonas C-glicosiladas (CLUE)	2,50 ± 0,16 ^a	2,49 ± 0,15 ^a
Teor de taninos (espectrofotometria UV)	0,142 ± 0,16 ^a	0,059 ± 0,005 ^b
Teor de Carboidratos (espectrofotometria UV)	8,0 ± 0,5 ^{ba}	41,4 ± 1,4 ^b

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados quantitativos de teor de flavonoides, taninos e carboidratos expressos como média ± desvio padrão (DP). Teste T-student (n=3). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes (p<0,001).

A prospecção fitoquímica (**Figura 20**) foi realizada com base em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa e em relatos da literatura científica para a espécie, que demonstraram a presença de saponinas, polissacarídeos, triterpenos, esteroides e flavonoides em diferentes extratos de *Costus spiralis*, *Costus spicatus* e *Costus arabicus*, conforme discutido no item de revisão da literatura (item 2.1.1) (AMORIM, 2013; DUARTE; ANDRADE; OLIVEIRA, 2017; SAAD *et al.*, 2021). A presença de taninos também foi avaliada uma vez que a análise do perfil cromatográfico obtido por CLUE para os extratos em diferentes comprimentos de onda, revelou a presença de um pico com espectro de UV característico de taninos condensados (**Figura 22**). Analisaram-se padrões de epicatequina, epigallocatequina e galato de epicatequina, mas os tempos de retenção não foram correspondentes. Na análise por CCD não foi possível verificar a presença de taninos nas condições propostas, provavelmente devido às baixas concentrações encontradas para essa classe de metabólitos em EAQ e EHE.

Figura 21 – Cromatoplasas obtidas para identificação de flavonoides (A), carboidratos (B) e saponinas (C) em EAQ e EHE

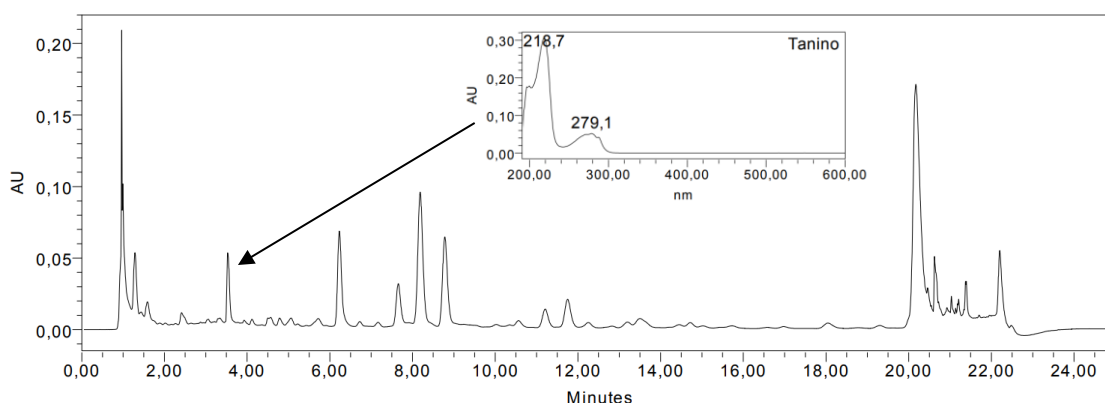


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: V&E = vicenina-2 e escafósídeo; G = glicose; E = escina; EAQ = extrato aquoso das folhas de *Costus spiralis*; EHE = extrato hidroetanólico 80% das folhas de *Costus spiralis*. Condições cromatográficas: fase estacionária: sílica-gel G/UV254; fase móvel: acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (10:1.1:1.1:2.5) (flavonoides), isopropanol:n-butanol:água:ácido acético (5:7:4:2) (carboidratos), clorofórmio: metanol: água (64:50:10) (saponinas); reveladores: solução de difenilborato de aminoetanol (flavonoides), anisaldeído sulfúrico (carboidratos); ácido sulfúrico a 5% v/v seguido de vanilina a 1% m/v (saponinas); detecção: λ 365 nm (flavonoides); visível (saponinas e carboidratos). Mais informações: vide item Materiais e método item 4.6.2

Em análise de ambos os extratos se observou a presença de flavonoides, carboidratos e saponinas. O método empregado por CLUE para identificação de flavonoides foi adaptado daquele desenvolvido para a identificação da droga vegetal, e o perfil obtido foi semelhante. Dessa forma, o método também apresenta potencial para ser utilizado como teste de identificação dos derivados de *C. spiralis*.

Figura 22 – Cromatograma obtido para extrato hidroetanólico 80% (EHE) de folhas de *Costus spiralis* em λ 270 nm



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: O espectro de UV apresentado na figura refere-se ao pico indicado pela seta. Condições cromatográficas: vide Material e Métodos, item 4.3.3.3.

Com base nos resultados obtidos, realizou-se a determinação quantitativa de taninos e carboidratos, além de flavonoides, conforme já discutido. Apesar do resultado negativo da análise qualitativa por CCD, foi possível determinar o teor de taninos, que mostrou-se relativamente baixo, sendo significativamente inferior para EAQ. Esse resultado, provavelmente é devido à presença de outras substâncias fenólicas, uma vez que o reagente fosfomolibdotúngstico não realiza reação de oxidação seletiva para taninos, mas sim para fenólicos em geral (SIMÕES *et al.*, 2017). A principal diferença entre os extratos foi evidenciada na quantificação de carboidratos, cujo teor pode ser considerado alto em ambos os extratos, mas mostrou-se elevado para EAQ. Para fornecer um parâmetro de comparação, a monografia das folhas de *Stevia rebaudiana* (estévia), utilizada como base para realização das análises, preconiza um teor de 12% (ANVISA, 2019a). É importante destacar que o método para quantificação de carboidratos deverá ser validado futuramente para confirmação do

resultado com maior confiabilidade, já que o método farmacopeico é específico para uma amostra diferente da analisada no presente estudo.

Dessa forma, podemos concluir que EAQ e EHE apresentam metabólitos em comum (saponinas, flavonoides, carboidratos e taninos), com teor semelhante de flavonas C-glicosiladas totais, mas mostram diferença significativa na quantidade de carboidratos e taninos e de substâncias de menor polaridade. Essas substâncias não foram determinadas no presente estudo, mas tal diferença pode ser evidenciada pelos perfis cromatográficos obtidos (**Figura 19**).

5.4 Caracterização dos extratos das folhas de *Costus spiralis* em ensaio químico de atividade antioxidante

A avaliação da potencial atividade antioxidante pelo ensaio químico do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) é um dos ensaios mais utilizados para derivados vegetais ricos em substâncias fenólicas, como é o caso de EAQ e EHE (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Avaliação prévia de extratos etanólicos de *Costus spiralis* e frações derivadas apresentaram baixa atividade nesse modelo, com valores de CE₅₀ superiores a 200 µg/mL, conforme classificação sugerida por Simirgiotis e colaboradores (2016) (AMORIM, 2013; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2016). Ainda assim, decidiu-se realizar o ensaio com o objetivo de caracterizar e comparar os dois extratos selecionados para o estudo.

Os valores obtidos para EHE e EAQ foram, respectivamente, 335 µg/mL e 886 µg/mL, ou seja, a atividade é baixa de acordo com o critério de Simirgiotis (2016) adotado. Considerando os flavonoides identificados nos extratos, não é esperada uma alta atividade antioxidante devido a sua estrutura química. De modo geral, quanto maior o número de grupos OH substituintes no esqueleto flavonoidico maior a atividade antioxidante observada. Sabe-se que a presença de dois grupos hidroxilas em relação *orto* nas posições 3' e 4' do anel B (grupo catecol) é uma das características mais relevantes para a ação antioxidante. Grupos 3-hidroxi e 4-oxo no anel heterocíclico C também são considerados importantes, e de forma menos relevante a presença de hidroxilas adicionais nas posições 5 e 7 podem contribuir para a atividade. Os flavonoides

vicenina-2, escafosídeo e seus isômeros não apresentam sistema *orto*-di-hidroxi nas posições 3' e 4' do anel B e de grupo 3 hidro no anel C, o que pode justificar o baixo potencial antioxidante (AGATI *et al.*, 2012; PIETTA, 2000; SIMÕES *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos contrariam aqueles descritos por De Souza e colaboradores (2018), que relataram uma alta atividade antioxidante de extrato aquoso das folhas de *Costus spiralis* (IC₅₀ = 11,82 mg/mL). As diferenças podem ser decorrentes de alterações nas condições do ensaio e na composição química dos extratos. Porém, conforme já citado, os resultados foram coerentes com dados obtidos anteriormente por Amorim (2017).

Adicionalmente, sugere-se, considerando os resultados obtidos neste e em estudos anteriores, que substâncias menos polares que os flavonoides identificados, incluindo agliconas ou fenólicos simples que podem estar presentes especialmente em EHE, contribuem mais para o efeito antioxidante observado, ainda que baixo.

5.5 Avaliação da toxicidade pré-clínica de extratos das folhas de *Costus spiralis*

A racionalização do uso medicinal de espécies vegetais e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, além do controle da sua qualidade e eficácia, deve envolver a determinação da segurança de sua utilização (MUKHERJEE *et al.*, 2017). Dessa forma, EAQ e EHE foram submetidos a ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo* como avaliação preliminar de sua segurança.

5.5.1 Avaliação da citotoxicidade

Os extratos foram avaliados frente a duas linhagens celulares, células hepáticas HepG2 no ensaio de MTT (**Figura 23**) e fibroblastos 3T3-A31 no ensaio de captação do vermelho neutro (**Figura 24**). Os valores de IC₅₀ obtidos estão resumidos na **Tabela 7**.

Em estudo anterior, a citotoxicidade de extrato hidroetanólico obtidos nas mesmas condições que EHE, foi avaliada em linhagens celulares HepG2 (hepática) e Hek (renal), obtendo-se

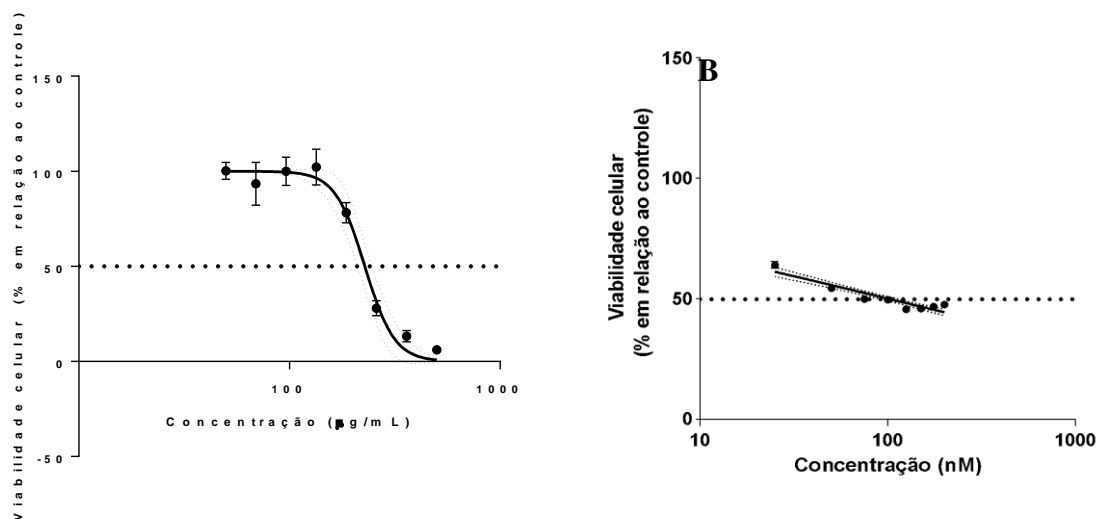
valores de IC₅₀ de 150 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Portanto, a avaliação de EHE obtida no presente estudo reproduziu o resultado anterior para células HepG2, reforçando o resultado encontrado e a constância da composição química dos extratos. Nos estudos anteriores, o extrato hidroetanólico não apresentou toxicidade na dose de 90 µg/mL em células THP-1, porém não foram avaliadas doses maiores (AMORIM, 2017; CASTILHO *et al.*, 2021).

Tabela 7 – Resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) de folhas de *Costus spiralis* frente a células HepG2 e fibroblastos 3T3-A31 e estimativa da toxicidade oral aguda

Resultados	EHE	EAQ
IC ₅₀ em células HepG2	102,60 µg/mL	228,00 µg/mL
IC ₅₀ em fibroblastos 3T3-A31	73,92 µg/mL	222,90 µg/mL
Estimativa da dose oral tóxica	523,82 mg/kg	788,84 mg/kg

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

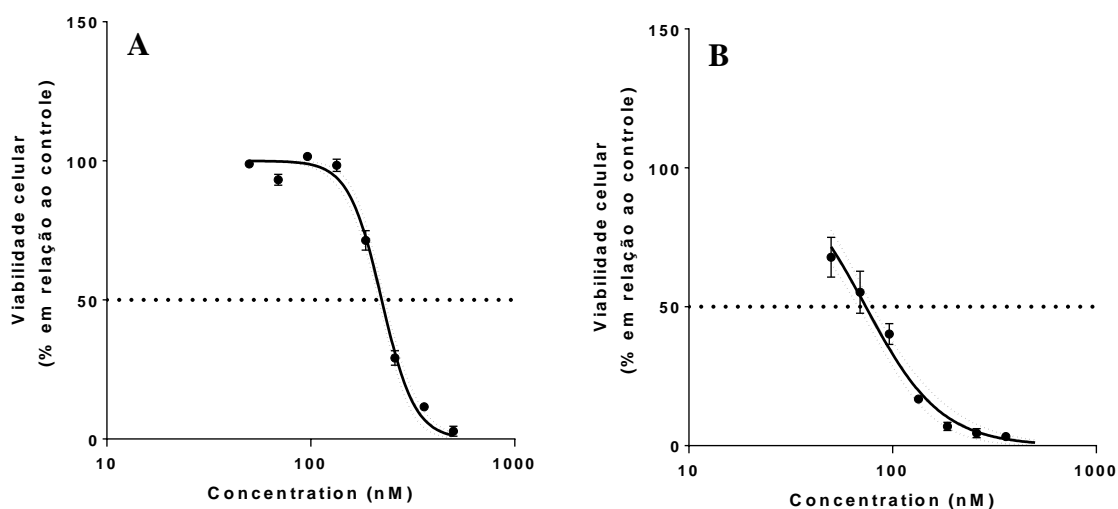
Figura 23 – Viabilidade celular da linhagem HepG2 frente ao extrato aquoso (EAQ) (A) e hidroetanólico 80% (EHE) (B) de folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média ± erro padrão.

Figura 24 – Viabilidade celular da linhagem fibroblastos 3T3-A31 frente ao extrato aquoso (EAQ) (A) e hidroetanólico 80% (EHE) (B) de folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão.

Os poucos relatos na literatura em relação à citotoxicidade de extratos de *Costus spiralis* são conflitantes e podem refletir as diferenças na composição química dos derivados vegetais analisados e as sensibilidades distintas das linhagens celulares avaliadas. Os resultados obtidos podem ser considerados intermediários considerando a faixa de valores encontrados em avaliações de citotoxicidade de *Costus spiralis* e outras espécies dos gêneros em outras linhagens celulares.

Alguns resultados mostraram relativa segurança de derivados vegetais da espécie, sendo que o extrato aquoso demonstrou citotoxicidade em células Madin Darby, provenientes de rim canino (MDCK) em concentrações de até 1000 mg/mL (DE CÓGÁIN *et al.*, 2015). Extrato metanólico nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 mg/mL não apresentaram citotoxicidade em hepatócitos, embora tenham apresentado efeito citotóxico na dose de 100 mg/mL em células Jurkat (PRÍNCIPE, SPIRA, 2009). Já estudo conduzido por Souza e colaboradores (2018) mostrou preocupação em relação a citotoxicidade de diferentes extratos da espécie em modelo de *Allium cepa*, os quais foram considerados citotóxicos nas doses de 4,5 mg/mL, 9,0 mg/mL e 18 mg/mL (DE SOUSA *et al.*, 2018). Considerando as demais espécies de *Costus* encontradas no Brasil, Cógain e colaboradores (2015) descreveram que *Costus arabicus* não apresentou citotoxicidade em linhagem MDCK até a concentração de 1000 μ g/mL.

Além de ser um indicativo de segurança *in vitro*, o método de captação do corante vermelho neutro é preconizado pela OECD 423 para predição da dose oral tóxica (OECD, 2010) e utilizado para classificação GHS. De acordo com as Nações Unidas (2011), a classificação GHS é o critério harmonizado para a classificação de substâncias de acordo com o risco para a saúde e para o ambiente. Substâncias podem ser alocadas nas categorias de um a cinco, baseadas na toxicidade aguda oral, dérmica ou de via inalatória, sendo 1 a de maior toxicidade e 5 a que engloba as substâncias mais seguras (UNITED NATIONS, 2011). Tanto EAQ quanto EHE foram classificados na categoria GHS 4, apresentando, portanto, bom perfil de segurança segundo esse critério.

Embora tenham sido enquadrados na mesma classificação, EHE apresentou valores maiores de IC₅₀ para as duas linhagens avaliadas, sugerindo que as substâncias de menor polaridade presentes em maior quantidade nesse extrato podem ser responsáveis por um maior potencial citotóxico. Uma investigação mais aprofundada nesse sentido pode ser importante para embasar o desenvolvimento de um fitoterápico à base de *Costus spiralis*.

Em relação à estimativa da dose oral tóxica para os extratos avaliados obteve-se os valores de 523,82 µg/mL para o extrato hidroetanólico e 788,84 µg/mL para o extrato aquoso, conforme apresentado na **Tabela 7**, os quais foram utilizadas como base para o delineamento da avaliação da toxicidade aguda, discutida a seguir.

5.5.2 Avaliação da toxicidade oral aguda

A fim de obter informações sobre a segurança de EHE e EAQ *in vivo*, realizou-se ensaio de toxicidade oral aguda segundo o guia da OECD 423 (OECD, 2001). Considerando que as doses orais tóxicas estimadas no modelo de predição de dose no ensaio de captação do corante vermelho neutro foram superiores a 300 mg/kg para ambos os extratos, iniciou-se a avaliação da toxicidade oral aguda com a dose de 2000 mg/Kg.

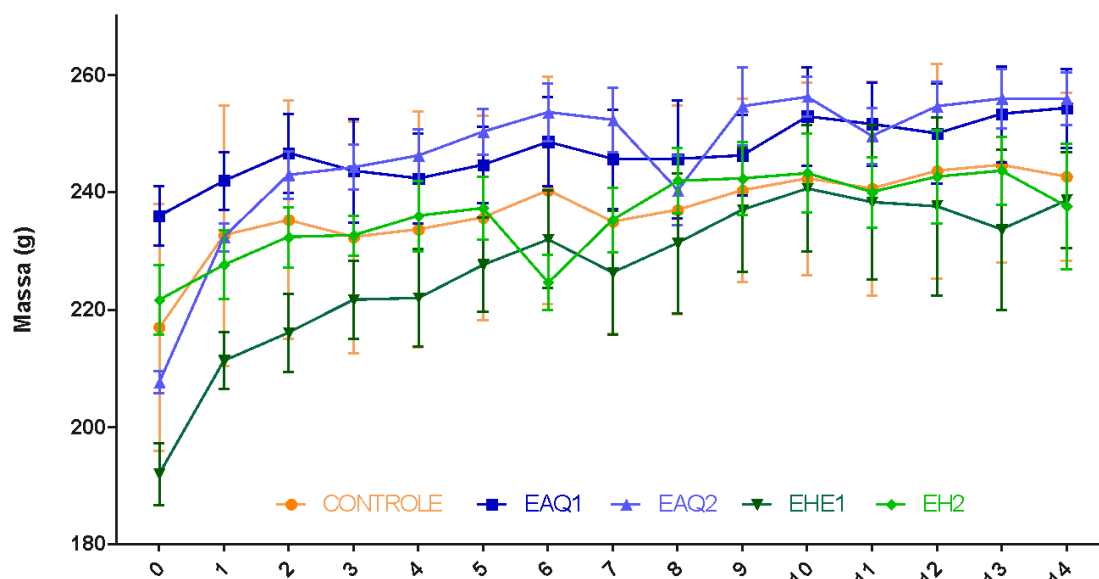
Em uma primeira etapa, 3 grupos foram avaliados (n=3): grupo CONTROLE, em que os animais receberam solução salina por gavagem no primeiro dia experimental (dia 0); grupo EAQ1, em que os animais receberam EAQ na dose de 2000 mg/kg por gavagem; e grupo EHE1, em que os animais receberam EHE na dose de 2000 mg/kg por gavagem. No guia da OECD, recomenda-se que os tratamentos sejam administrados em dose única, mas quando não é possível, são permitidas mais administrações desde que em um intervalo de 24 horas. Devido à baixa solubilidade de EHE em solução salina, veículo utilizado para dissolução, a dose desse extrato foi dividida em duas administrações com um intervalo de 1 hora entre cada uma delas. Os demais tratamentos foram administrados em dose única.

Não foi observada morte na primeira etapa do experimento. Sendo assim, foi realizado novo ensaio repetindo-se o mesmo procedimento e dose para os dois extratos, sendo que o grupo CONTROLE não foi avaliado novamente, conforme preconizada pela OECD (2001). Os grupos avaliados foram denominados EAQ2 e EHE2, e, como resultado deste segundo experimento, novamente não houve nenhuma morte. Este resultado já classifica a dose segura máxima para ambos os extratos como 2.000 mg/kg para administração oral aguda (OECD, 2001).

Porém, a OECD recomenda que sejam observados possíveis sintomas de toxicidade nos grupos avaliados. Dessa forma, todos os animais foram observados no dia da administração e por mais 14 dias, sendo determinados diariamente a massa e o consumo hídrico e alimentar. Foram também verificados sinais comportamentais e clínicos para o reconhecimento de toxicidade, tais como dor, estresse ou sofrimento. Vários são os sinais que indicam que os animais estão passando por algum desconforto, incluindo alterações no consumo alimentar e hídrico, perda de massa, presença de secreção nos olhos e nariz, alterações na pelagem e da postura corporal, agressividade, vocalização do animal, resistência ao manejo, baixa higiene, fezes alteradas em volume, consistência e cor, entre outros (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

A avaliação diária do consumo hídrico e alimentar médio de cada gaiola não mostrou qualquer tendência que indicasse efeito dos extratos nesses parâmetros (dados não apresentados). Também não se verificou alterações significativas na massa corporal dos ratos (**Figura 25**).

Figura 25 – Massa dos animais avaliados em modelo de toxicidade oral aguda ao longo do período experimental (dias 0 a 14) em extratos de folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

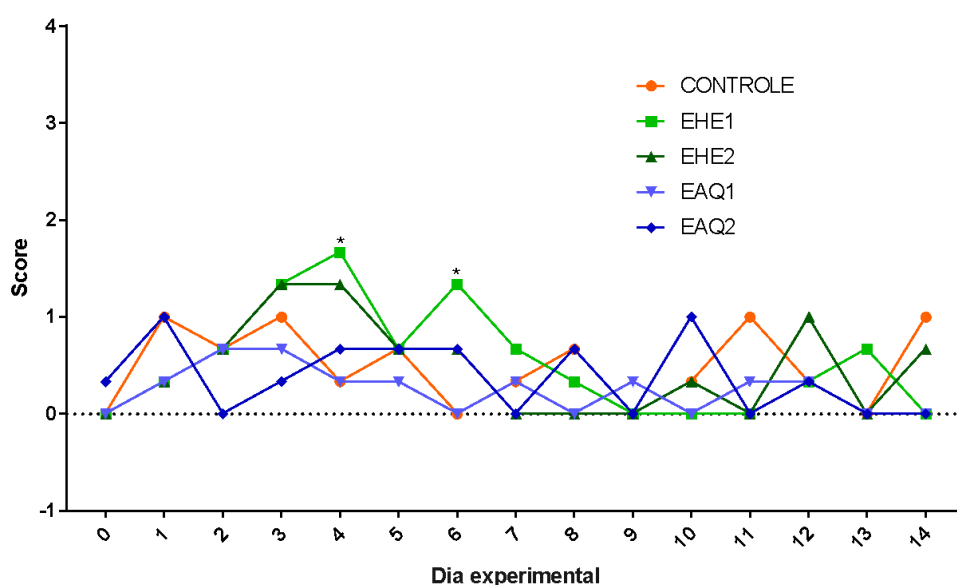
Nota: Dados expressos como média + erro padrão (N=3). Teste: Multiple T-test. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. EAQ: extrato aquoso das folhas de *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas de *Costus spiralis*.

Entretanto, foram observados alguns sinais de estresse durante o período experimental para todos os grupos, provavelmente decorrentes do próprio desconforto gerado pelo manejo dos animais. Os principais sinais observados foram agitação, principalmente no início do experimento, e secreção avermelhada nos olhos. A agitação, ou até mesmo a agressividade dos animais no início de um ensaio é comum, uma vez que o novo ambiente e o contato com pessoas diferentes geram estresse e inquietação. Já a presença de secreção ocular é um achado comum em rotinas de ensaios *in vivo* (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). A secreção ocorre devido à presença de um pigmento vermelho denominado porfirina nos olhos dos ratos, a qual é secretada em situações de estresse (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Esse sinal foi observado em todos os grupos, incluindo o CONTROLE. Outros sinais de estresse observados foram alterações nas fezes e pêlo e vocalização dos animais, os quais foram descritos previamente por Andrade, Pinto e Oliveira (2002).

A fim de obter uma avaliação mais objetiva dos sinais de toxicidade citados, realizou-se a determinação de escore de distresse conforme apresentado no item 4.7.2. Na **Figura 26**, são

apresentados os resultados obtidos. Observou-se um aumento do escore do grupo EHE81 em relação ao CONTROLE e ao grupo EAQ1 nos dias 3 e 6. Essa avaliação é limitada uma vez que o n experimental é relativamente pequeno para avaliação de variáveis discretas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Além disso, a pontuação para todos os grupos foi relativamente baixa se considerarmos avaliações semelhantes para substâncias sabidamente tóxicas (ATIQ *et al.*, 2019) e se manteve praticamente constante.

Figura 26 – Escore de distresse dos animais avaliados em modelo de toxicidade oral aguda ao longo do período experimental (dias 0 a 14) em extratos de folhas de *Costus spiralis*

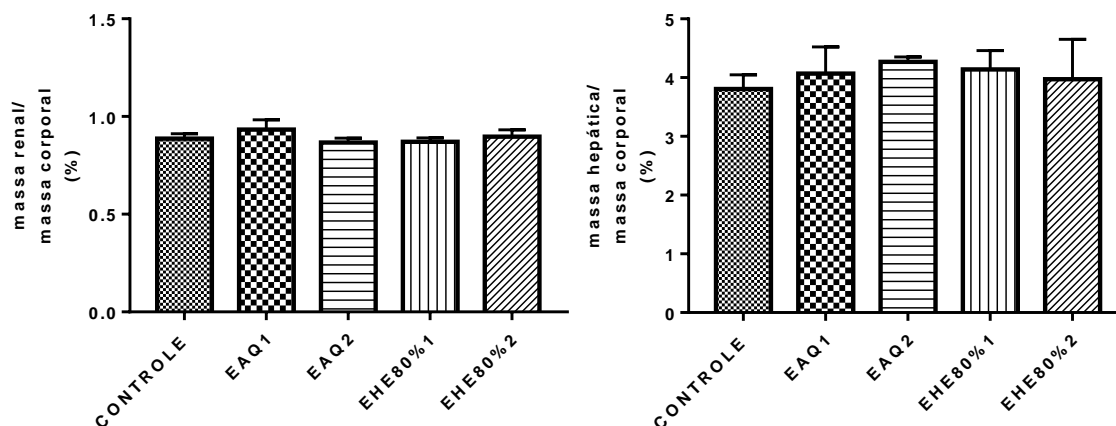


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados apresentados como médio do grupo n=3. Teste: ANOVA two-way seguido de pós teste de Tukey. # = $p < 0,05$ entre EHE e EAQ; * = $P < 0,05$ entre EHE1 e EAQ 1 e EHE 1 e CONTROLE. EAQ: extrato aquoso das folhas de *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas de *Costus spiralis*.

Após a eutânasia de todos os grupos experimentais, verificou-se a ausência de alterações macroscópicas nos órgãos, sendo que os rins e o fígado foram extraídos e pesados para determinação da porcentagem de massa renal e hepática em relação à massa corporal. Não foram observadas alterações significativas na massa e na porcentagem da massa renal e hepática em relação à massa corporal para os dois extratos (**Figura 27**). A análise histológica dos órgãos não evidenciou qualquer alteração (dados não apresentados).

Figura 27 – Porcentagem da massa renal e hepática em relação à massa corporal dos animais avaliados em modelo de toxicidade oral aguda ao final do período experimental (dia 14) em extratos de folhas de *Costus spiralis*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA One way (n=3). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratamento e os controles EAQ: extrato aquoso das folhas de *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas de *Costus spiralis*.

Dessa forma, uma vez que não foi verificada morte de nenhum animal, EHE e EAQ podem ser classificados na categoria GHS 5, considerando o resultado deste ensaio, apresentando toxicidade aguda superior a 2000 mg/kg e, portanto, podem ser considerados como produtos de alta segurança aguda.

Os resultados obtidos EAQ são particularmente promissores, considerando sua similaridade química com o decocto da espécie utilizado tradicionalmente há séculos, o que já seria indicativo da segurança da espécie ao longo dos anos. Avaliações futuras relativas à genotoxicidade e segurança reprodutiva seriam importantes para o desenvolvimento de um fitoterápico, mas não obrigatórias, conforme recomendado pelo Guia nº 22/2019 da ANVISA já que dados de uso seguro ao longo dos anos não permite inferências nesse sentido (ANVISA, 2019b). Já a necessidade de condução de experimentos para avaliação da toxicidade pré-clínica por dose repetida ou de toxicidade crônica deve ser avaliada criticamente, considerando a ética na utilização de animais experimentais. Ensaio clínicos podem ser interessantes para as etapas seguintes deste estudo.

5.6 Avaliação da eficácia pré-clínicas de extratos das folhas de *Costus spiralis* em modelo experimental de Doença Renal Crônica

A fim de investigar o uso popular de *Costus spiralis* no tratamento de doenças renais, procedeu-se a avaliação da atividade de EAQ e de EHE em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorubicina *in vivo* que, em geral, induz em roedores alterações renais semelhantes às principais características da SN em humanos, ou seja, proteinúria intensa, hipoalbuminemia e edema, embora nem sempre essas três características sejam observadas nos animais. Esse ensaio foi escolhido por ser considerado um modelo característico de DRC (PEREIRA *et al.*, 2015).

A atividade do extrato EHE na recuperação da função renal em ratos foi previamente demonstrada em modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina, que leva, em geral, a um quadro de IRA, caracterizado por lesão tubular, alterações na capacidade de concentração de urina e modificações na hemodinâmica renal (ALI; AL MOUNDHRI, 2006; AMORIM *et al.*, 2022). No presente estudo, buscou-se avaliar a potencial atividade dos extratos selecionados de *Costus spiralis* no tratamento de doenças renais, utilizando um modelo com características diferentes, no intuito de investigar a utilização popular dessa espécie, empregada para o tratamento de múltiplas doenças renais.

5.6.1 Experimento piloto para definição das condições do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina

Primeiramente, foi realizado um experimento piloto com o modelo experimental de SN a fim de padronizá-lo no LabTox e definir o tempo do tratamento e o período experimental total. O planejamento do experimento piloto se baseou em estudos anteriores nos quais esse modelo foi utilizado, principalmente no trabalho realizado por Pereira e colaboradores (2015). Foram avaliados dois grupos experimentais: DOX, em que os animais receberam dose de 7,5 mg/kg de doxorubicina IV na cauda no primeiro dia experimental (Dia 0) e CONTROLE, no qual os animais foram anestesiados no dia 0 e receberam injeção IV de solução salina na cauda. Depois da indução da doença, os animais foram observados por 28 dias. Para avaliação do experimento piloto, os seguintes parâmetros foram determinados: massa corporal, porcentagem de massa renal em relação à massa corporal, dosagem de creatinina urinária e plasmática, depuração de

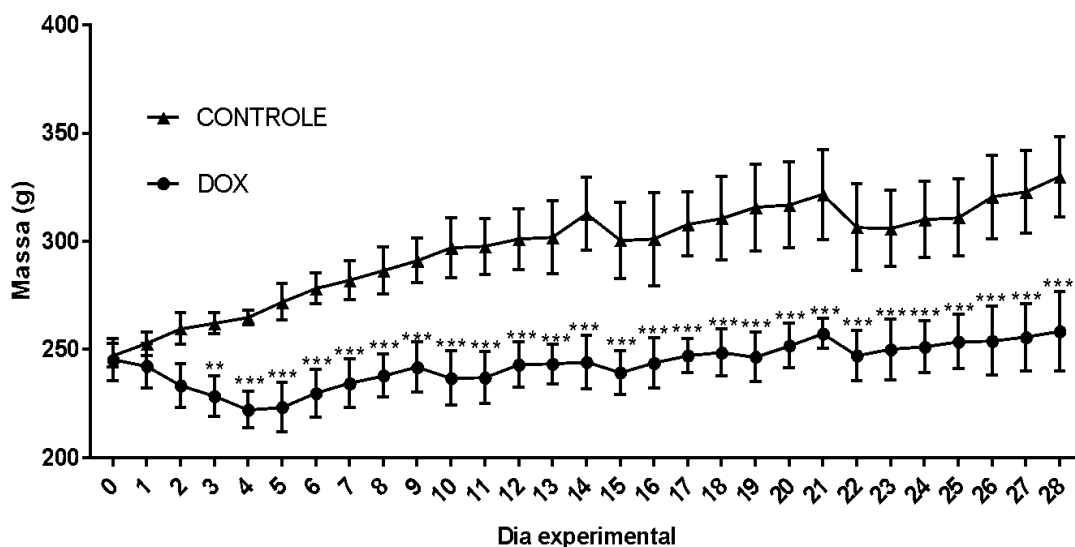
creatinina, proteinúria e captação de ^{99m}Tc -DMSA em exame de cintilografia renal. Adicionalmente, as urinas foram analisadas diariamente utilizando fita de urinálise.

A redução da massa corporal após a administração de doxorubicina é um resultado comum no modelo estudado que, em geral, é observado durante alguns dias ou até semanas após a injeção do quimioterápico. Posteriormente, os animais passam a ganhar massa, mas de forma mais discreta que os animais saudáveis. Essas alterações têm sido associadas à redução da ingestão de alimentos ou à inibição da síntese de proteínas (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; LI; SINGAL, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018). Já foi demonstrado que a administração de doxorubicina causa anorexia nas primeiras 24 horas após a injeção, assim como leva ao aparecimento de lesões na mucosa oral, o que também pode justificar a menor ingestão alimentar (PEREIRA *et al.*, 2015).

No dia 0, antes da administração de doxorubicina, não foi observada diferença entre as massas dos animais dos dois grupos, atestando a homogeneidade inicial dos grupos. A partir do 1º dia após a administração, verificou-se redução da massa corporal média dos animais até o 4º dia experimental no grupo DOX. Posteriormente, foi observado o aumento progressivo e lento da massa corporal desses animais, o que não foi suficiente para que o grupo DOX se equiparasse ao grupo CONTROLE ao final dos 28 dias do experimento (**Figura 28**).

Assim como relatado na literatura, os resultados obtidos sugerem uma relação entre a redução da massa corporal e o consumo alimentar dos animais. Esse parâmetro não foi avaliado no dia 0, mas é possível observar a diferença entre a massa de ração ingerida pelos animais após a administração da doxorubicina do grupo DOX em relação ao grupo CONTROLE (**Figura 29**). O padrão alimentar começa a normalizar a partir do 5º dia experimental, coincidindo com o momento em que os animais voltam a ganhar massa.

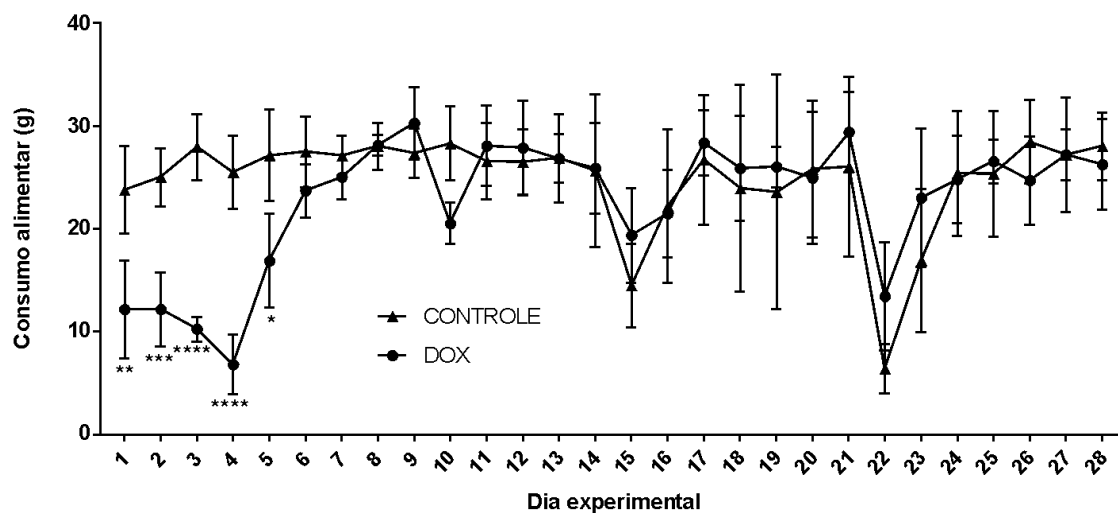
Figura 28 – Massa dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni (n=8). * indicam diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. DOX: doxorrubicina.

Figura 29 – Consumo alimentar dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao longo do período experimental (dias 1 a 28)

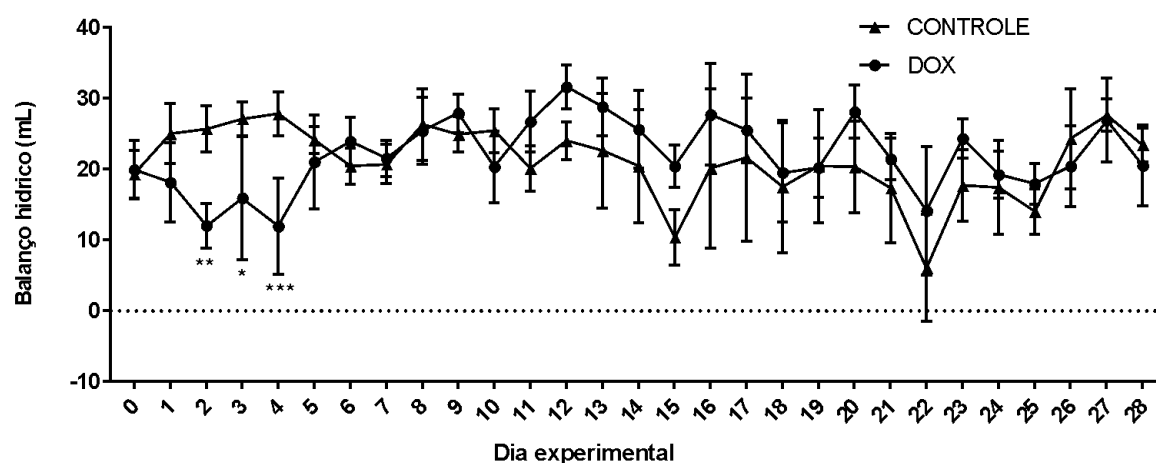


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni (n=8). * indicam diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$. DOX: doxorrubicina.

A SN pode estar associada a um balanço hídrico anormal (CAMERON, 1987; XU *et al.*, 2015). No entanto, a maioria dos autores que utilizaram modelo de SN induzida por doxorubicina não avaliaram este parâmetro. Dentre os poucos trabalhos que estudaram o efeito da doxorubicina no balanço hídrico, Xu, Johnson e Thunhorst (2015) relataram maior consumo hídrico a partir da 3ª semana da indução da doença, enquanto Pereira (2013) não encontrou diferença entre o volume urinário e consumo de água nesse modelo. No presente estudo, foi evidenciada a redução significativa do balanço hídrico logo após a administração da doxorubicina, o que pode ser justificado pelo menor consumo de água nesse período, o qual coincide com a menor ingestão alimentar descrita anteriormente. Nos demais dias experimentais não foi observada diferença estatística (**Figura 30**).

Figura 30 – Balanço hídrico dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28)



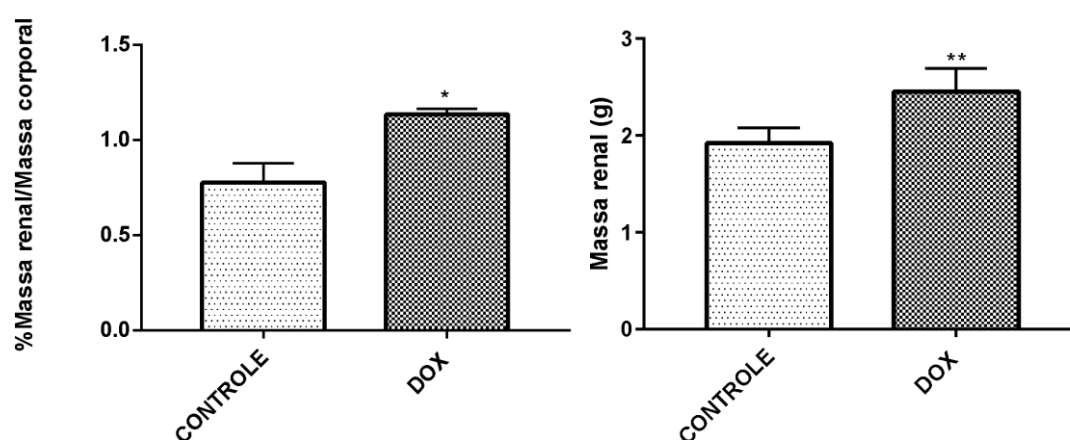
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni (n=5). * indicam diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Balanço hídrico = consumo hídrico – volume urinário. DOX: doxorubicina.

Outro parâmetro biométrico avaliado foi a porcentagem da massa renal em relação à massa corporal ao final do período experimental. Observou-se aumento dessa relação no grupo DOX, o que é compatível com os relatos em estudos anteriores. Na avaliação dos rins separadamente também foi possível evidenciar maior massa renal nos animais tratados com DOX (**Figura 31**). Em geral, observa-se aumento da massa renal dos animais tratados com doxorubicina o que, associado à perda de massa corporal ou menor ganho desta quando comparada ao grupo

controle, resulta no aumento da razão entre as duas variáveis. As avaliações feitas no presente estudo não permitem afirmar a causa do aumento da massa renal, mas autores que também investigaram o modelo sugeriram que esse resultado se deve, provavelmente, a formação de edema local e fibrose no tecido renal (LI *et al.*, 2020; PEREIRA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Figura 31 – Porcentagem da massa renal/massa corporal e massa renal dos animais avaliados no experimento piloto no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao final do período experimental (dia 28)



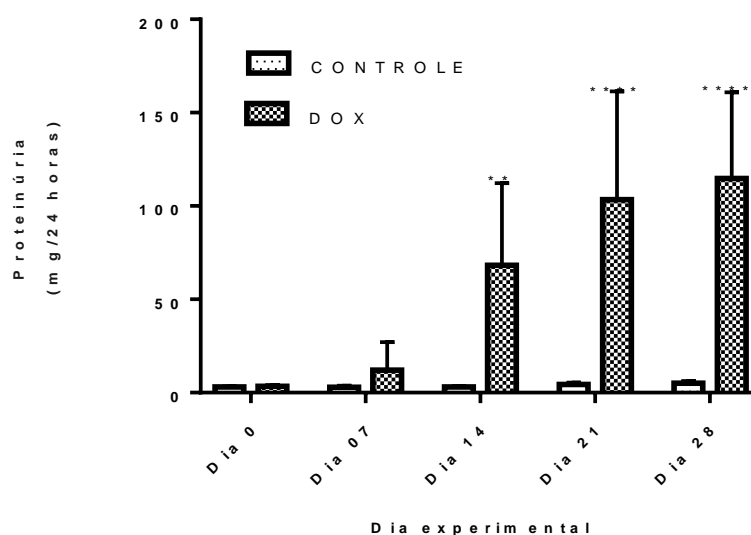
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: T-student (n=5). * indicam diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,05$). DOX: doxorrubicina.

Além dos parâmetros biométricos descritos, análises bioquímicas das amostras de urina e plasma foram realizadas para determinação da depuração de creatinina e proteinúria, sendo esta última a principal característica da SN e, portanto, sua quantificação pode ser utilizada para confirmar a eficácia do modelo experimental (PEREIRA *et al.*, 2015). Em geral, a administração IV de doxorrubicina em doses próximas a 7,5 mg/kg é capaz de induzir proteinúria intensa que persiste por vários meses em roedores (BERTANI *et al.*, 1986; PEREIRA *et al.*, 2015). Os relatos na literatura científica para essa dose mostram que a proteinúria começa a aumentar após cerca de 7 dias da indução da doença, sendo observados valores significativamente mais altos por volta de 14 dias após a administração do quimioterápico, perfil observado no presente estudo (**Figura 32**) (DA SILVEIRA *et al.*, 2013; MUÑOZ *et al.*, 2011; PEREIRA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; SUTARIYA; SARAF, 2018; TAKAHASHI; IKEZUMI; SAITOH, 2017; ZAN *et al.*, 2017). Esses resultados, associados aos

parâmetros biométricos já discutidos, evidenciam que a execução do modelo induziu adequadamente o quadro clínico esperado.

Figura 32 – Proteinúria dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28)

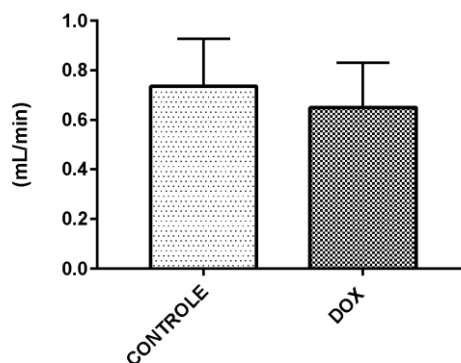


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni (n=5). * indicam diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$. DOX: doxorrubicina.

Além da proteinúria, relata-se na literatura o aumento dos níveis de creatinina sérica e redução da depuração da creatinina em animais com SN. A variação em geral é discreta, mesmo quando evidenciada a diferença estatística (PEREIRA *et al.*, 2015; ZAN *et al.*, 2017). Por outro lado, também foram encontrados relatos de autores que não observaram alterações significativas nos níveis séricos e/ou urinários de creatinina (DA SILVEIRA *et al.*, 2013; PEREIRA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019), o que é compatível com os resultados do presente estudo para o experimento piloto, apresentados na **Figura 33**.

Figura 33 – Depuração de creatinina dos animais avaliados no experimento piloto no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao final do período experimental (dia 28)



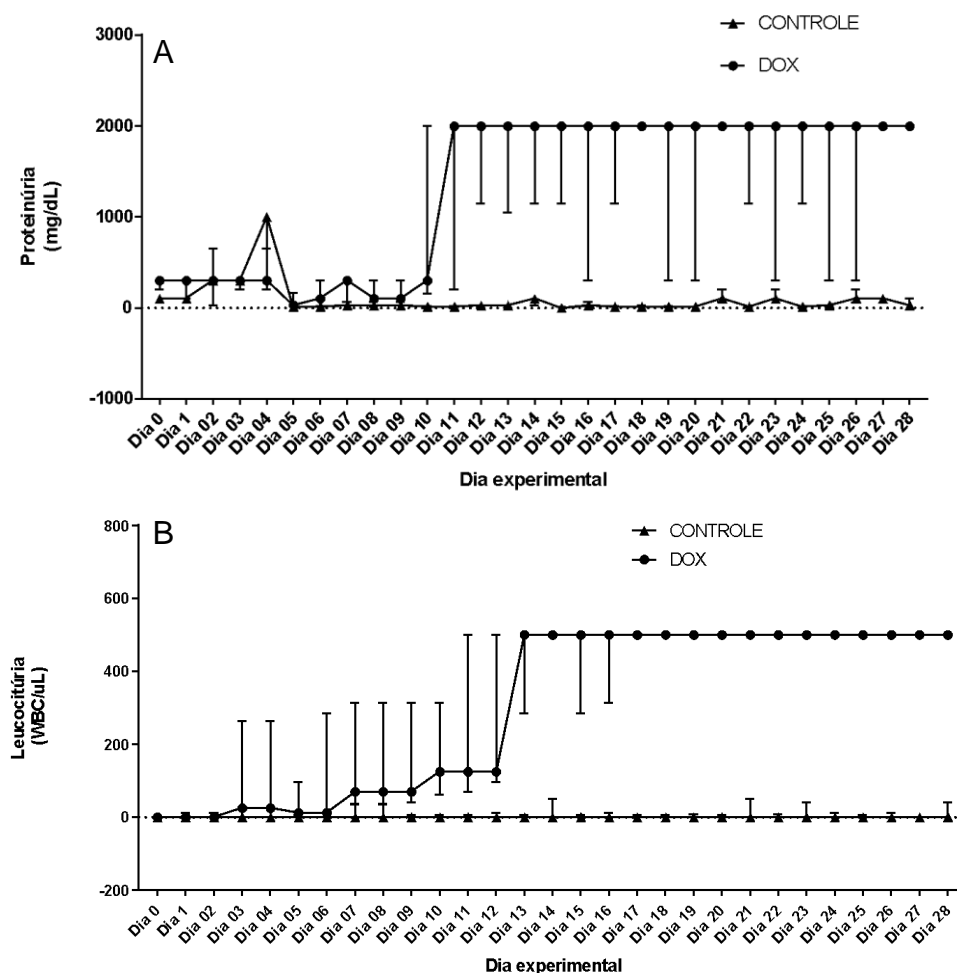
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: T-student (n=5). Não foi observada diferença estatística entre os dados. DOX: Doxorrubicina.

Realizou-se ainda análises semi-quantitativas diárias das amostras de urina por meio de fita de urinálise. Não foram observadas diferenças relevantes entre os parâmetros avaliados, exceto para proteinúria e leucocitúria. As análises permitiram o acompanhamento detalhado dos animais durante o experimento. Os resultados demonstraram, por exemplo, que a proteinúria foi máxima a partir do 11º dia experimental, considerando a escala da fita de urinálise (**Figura 34**). Foi possível observar ainda o aumento da leucocitúria nos animais do grupo DOX (**Figura 34**), sendo este um achado clínico comum em pacientes com DRC (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

A análise histológica dos rins não evidenciou lesão glomerular por meio de microscopia óptica convencional e coloração com hematoxilina eosina nos animais do grupo DOX (imagens não apresentadas). Esse resultado pode ser justificado pelo fato desse modelo, no período avaliado, gerar um perfil de lesão que pode ser comparado àquele observado para SN por lesões mínimas (RUSSO, 2017). Neste caso, a lesão está localizada nos podócitos e é visível apenas por microscopia eletrônica, sendo que não foi possível realizar tal análise no presente estudo.

Figura 34 – Determinação semi-quantitativa da proteinúria (A) e leucocitúria (B) dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao longo do período experimental (dias 0 a 28)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: determinação semi-quantitativa, por fita de urinalise, de proteína na urina (A); e de leucócitos na urina (B); dados expressos como média + intervalo interquartil. DOX = doxorrubicina.

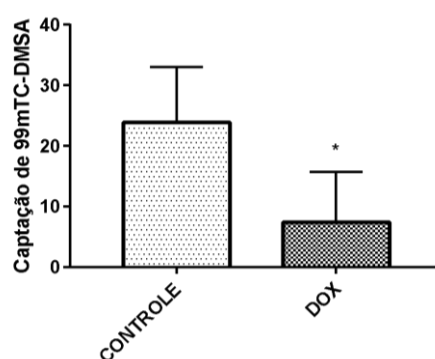
Para avaliar com maior acurácia a redução de tecido renal funcional, foi utilizada a cintilografia renal estática. Autores sugerem que a triagem cintilográfica com a medição da reatividade tecidual pode ser um método alternativo e/ou complementar às análises histopatológicas para indicar redução de tecido renal funcional em modelos de nefrotoxicidade (AYGUN; GUL, 2019; CABUK *et al.*, 2008; DEMIR; DEMIR; AYGUN, 2020, 2021).

O ácido dimercaptosuccínico Technetium-99m (^{99m}Tc -DMSA) é um dos principais radiofármacos utilizados em exames de cintilografia renal, sendo considerado como o melhor radiofármaco disponível para a detecção de tecido renal funcionante, sobretudo na região cortical. O radiofármaco sofre absorção tubular, sendo retido pelo córtex renal. A Cintilografia por ^{99m}Tc -DMSA é utilizada na prática clínica para avaliação estrutural dos rins, como presença de cicatrizes renais, bem como para avaliação de tecido renal funcionante (HIRONAKA, 2012).

Em modelos experimentais de nefrotoxicidade, tem-se mostrado um método sensível e confiável para detecção precoce de redução de tecido renal funcionante. Esses estudos incluem avaliações da toxicidade renal induzida por doxorrubicina em ratos Wistar, os quais relataram que a administração do quimioterápico diminui a captação de ^{99m}Tc -DMSA em relação a ratos saudáveis (AYGUN; GUL, 2019; CABUK *et al.*, 2008; DEMIR; DEMIR; AYGUN, 2020, 2021)

De forma coerente com os relatos da literatura, o grupo DOX apresentou redução significativa na captação de ^{99m}Tc -DMSA quando comparada com o grupo controle, conforme apresentado na **Figura 35**, indicando redução do tecido renal funcionante.

Figura 35 – Captação de ^{99m}Tc -DMSA obtida por cintilografia renal dos animais avaliados no experimento piloto do modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina ao final do período experimental (dia 28)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média ± desvio padrão. Teste:T-student (n=5). * indica diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE (p<0,05).

5.6.2 Ensaio para avaliação do efeito de EAQ e EHE em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina

Para a avaliação dos efeitos dos extratos selecionados no modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina, além dos grupos CONTROLE e DOX, avaliou-se um grupo de animais tratados com losartana na dose de 15 mg/kg (DOX + LOS), selecionado como controle positivo e grupos tratados com os extratos aquoso (DOX + EAQ) e hidroetanólico 80% (DOX + EHE), ambos na dose de 5 mg/kg. Determinou-se um período experimental de 21 dias baseados nos resultados obtidos com o experimento piloto.

A avaliação de um grupo tratado com losartana permitiu a comparação do efeito dos extratos com um fármaco de efeito já conhecido na redução da proteinúria e utilizado na prática clínica para este fim (BRASIL, 2021). A dose foi estabelecida com base em estudo do efeito do fármaco no modelo avaliado em condições semelhantes às utilizadas no presente estudo (MUÑOZ *et al.*, 2011). Já a dose dos extratos baseou-se em estudo prévio em modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina, em que EHE apresentou atividade na recuperação da função renal na dose de 5 mg/kg (AMORIM *et al.*, 2022). A avaliação da mesma dose no modelo de SN teve o intuito de possibilitar a comparação dos resultados obtidos nos dois modelos.

No experimento piloto, observou-se toxicidade local da doxorrubicina na cauda dos animais, onde é realizada a administração. Esse é um efeito adverso comum devido ao extravasamento do fármaco no momento da aplicação e é considerado uma das maiores desvantagens desse modelo (PEREIRA *et al.*, 2015). Na tentativa de minimizar a toxicidade observada, alguns cuidados foram tomados, incluindo maior atenção à higienização dos animais e gaiolas, limpeza e contato do local de aplicação com água fria após a administração de doxorrubicina e injeção de solução salina por via IV após aplicação do fitoterápico (NEUWALD, 2009).

Assim como descrito para o experimento piloto, os seguintes parâmetros foram determinados: massa corporal, razão massa renal/massa corporal, dosagem de creatinina urinária e plasmática, depuração de creatinina e proteinúria. Adicionalmente, as urinas foram analisadas diariamente

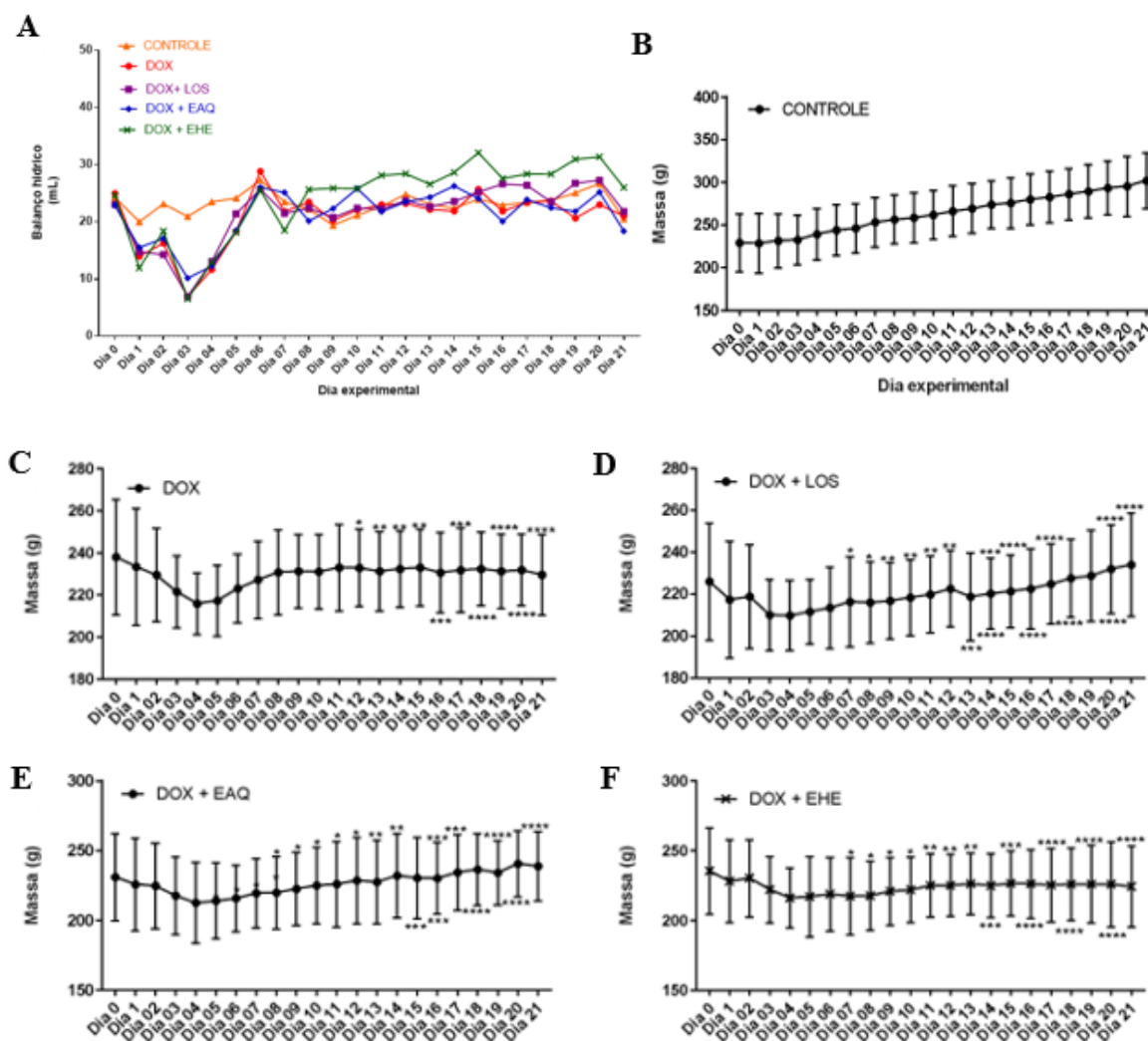
utilizando fita de urinálise. Determinou-se ainda a osmolaridade plasmática e urinária das amostras coletadas e os animais foram submetidos à cintilografia renal utilizando ^{99m}Tc -DMSA ao final do período experimental. Por fim, as amostras de plasma foram submetidas a estudo de metabolômica utilizando CG-MS.

A variação da massa corporal dos animais apresentou padrão semelhante ao observado no experimento piloto. Verificou-se redução inicial, seguido de aumento discreto ou estabilização a partir do 7º dia (**Figura 36**). Nenhum dos tratamentos avaliados foi capaz de restabelecer a massa corporal dos animais. Estudo do efeito da losartana nesse mesmo modelo por Muñoz e colaboradores (2011) também demonstrou que os animais tratados com o fármaco apresentaram diferença estatística no valor de massa final, 5 semanas após administração do quimioterápico.

Os resultados obtidos para porcentagem da massa renal em relação à massa corporal também foram compatíveis aos obtidos com o experimento piloto, verificando-se o aumento da razão massa renal/massa corporal e da massa corporal no grupo DOX em relação ao grupo CONTROLE, resultado também observado para DOX + EHE80%. Já nos grupos DOX + LOS e DOX + EAQ, os valores obtidos foram significativamente menores que os observados para o grupo DOX, demonstrando que esses tratamentos conseguiram reverter ou impedir o aumento da massa renal (**Figura 37**). Como já discutido anteriormente, com os dados obtidos no presente estudo não é possível determinar os mecanismos envolvidos na redução desses parâmetros. Porém existem relatos na literatura de diferentes substâncias e preparações fitoterápicas ativas nesse modelo que foram capazes de reduzir o aumento da porcentagem de massa renal/massa corporal e/ou a massa renal isoladamente observados no modelo estudado (AFSAR *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2015; SUTARIYA, SARAF; 2018; ZHANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019)

Assim como observado para o experimento piloto, o balanço hídrico também não foi afetado de forma significativa após administração de doxorubicina, não sendo observadas variações também em relação aos tratamentos avaliados. Observou-se decréscimo no balanço hídrico devido à menor ingestão de água logo após a administração de doxorubicina, especialmente no 3º e 4º dias, porém, a partir do 5º dia verificou-se a aproximação dos valores com os do grupo CONTROLE (**Figura 38**).

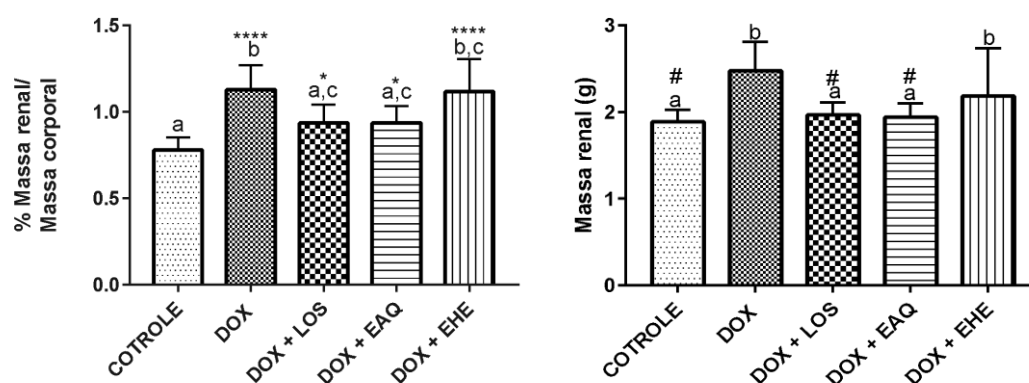
Figura 36 – Massa média dos animais avaliados em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média (A) ou média \pm desvio padrão (B-F). Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=8). * indica diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$. DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

Figura 37 – Porcentagem da massa renal em relação à massa corporal dos animais avaliados em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)

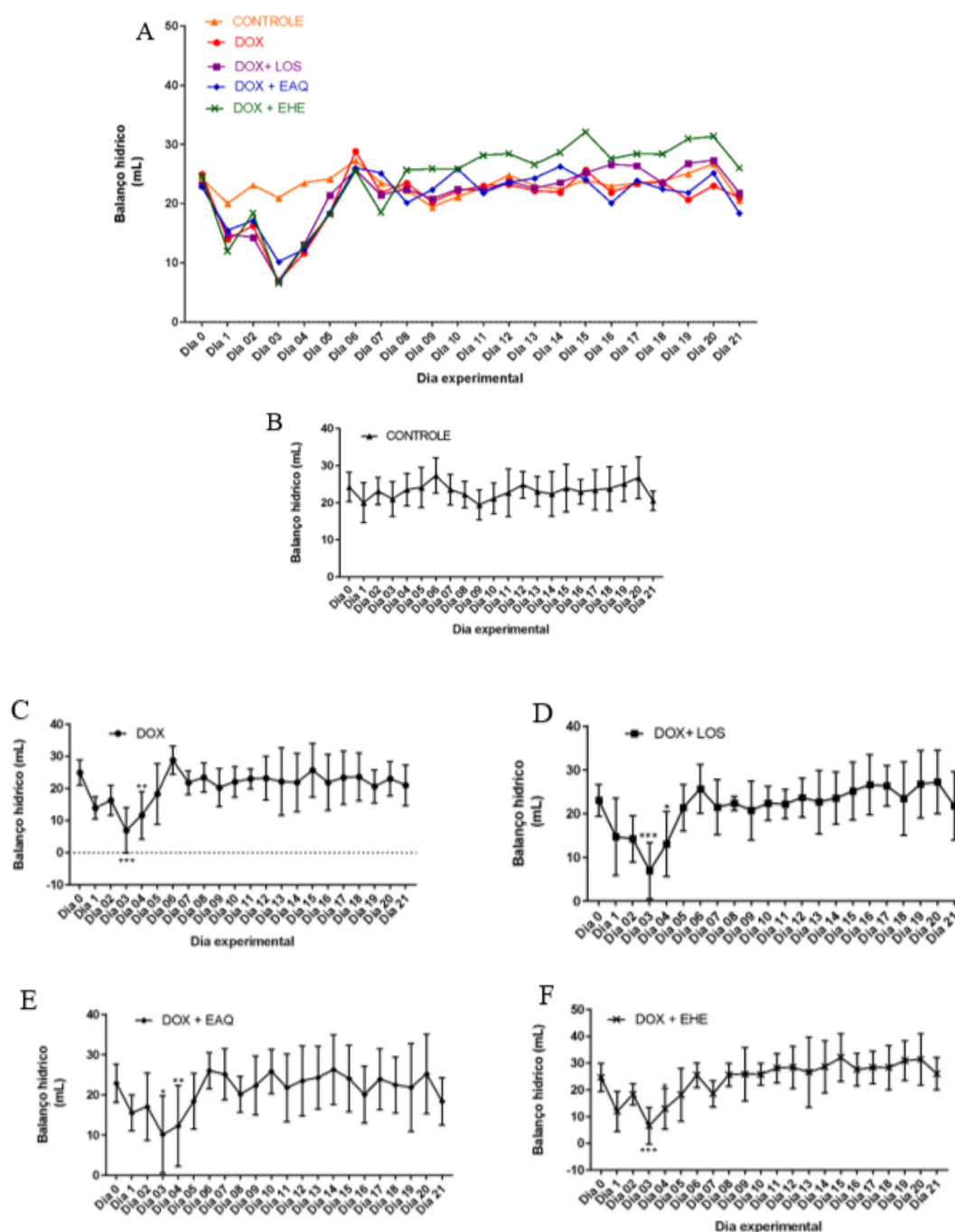


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=8). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo que: **** indicam $p < 0,001$ em relação ao grupo CONTROLE e * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo DOX, # indica $p < 0,05$ em relação ao grupo DOX. DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

É possível observar na **Figura 38** uma tendência dos animais do grupo DOX + EHE em apresentar maior valor de balanço hídrico. Na avaliação do volume urinário separadamente, EHE apresentou valores superiores quando comparados ao grupo CONTROLE a partir do 18º dia (**Figura 38**). Resultado semelhante foi observado para EHE em estudo anterior com modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina (AMORIM, 2017; AMORIM *et al.*, 2022). É possível que EHE tenha algum efeito diurético, o que não foi observado para EAQ.

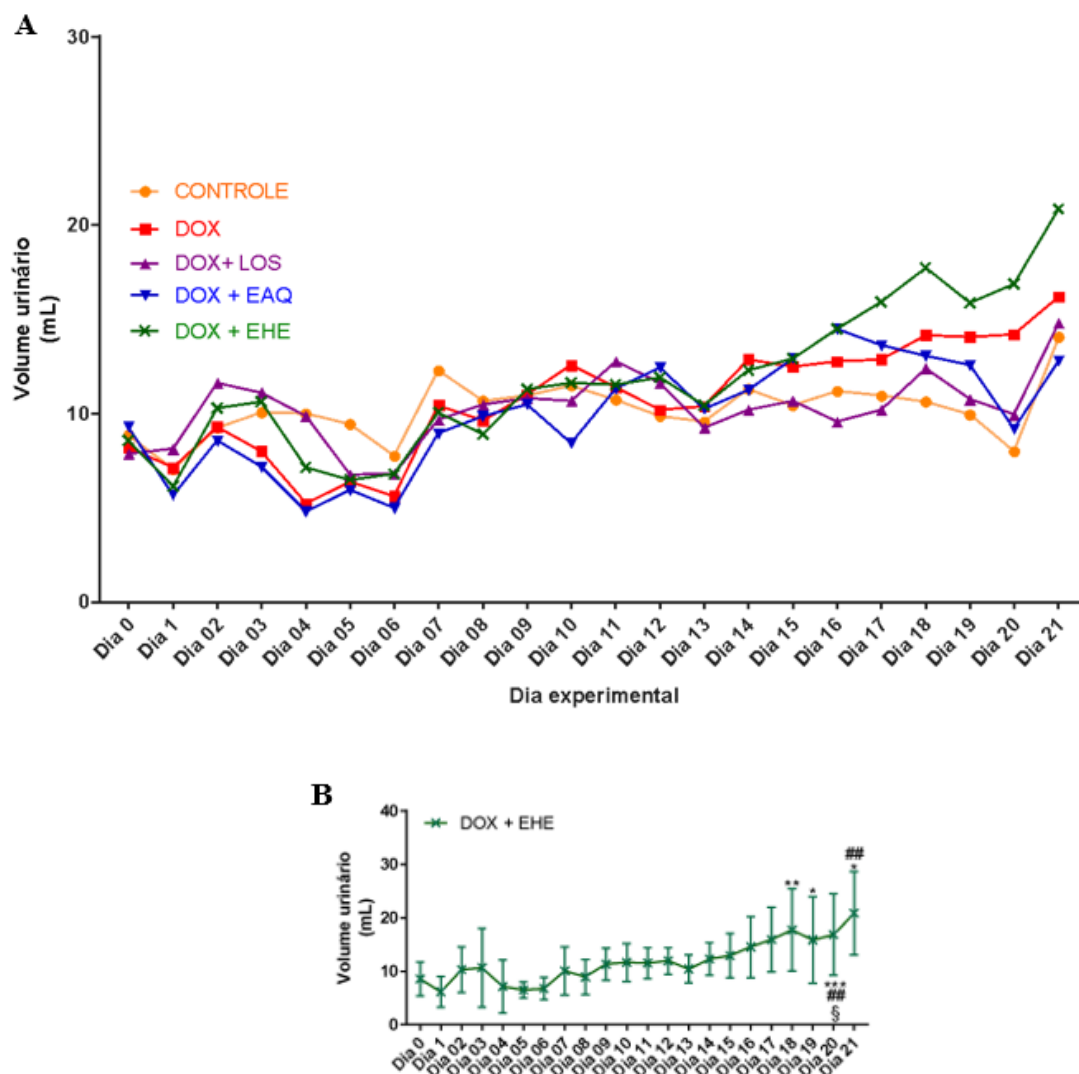
Figura 38 – Balanço hídrico dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média (A) ou média \pm desvio padrão (B-F). Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=8). * indicam diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$. Balanço hídrico = consumo hídrico – volume urinário. DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

Figura 39 – Volume urinário dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)



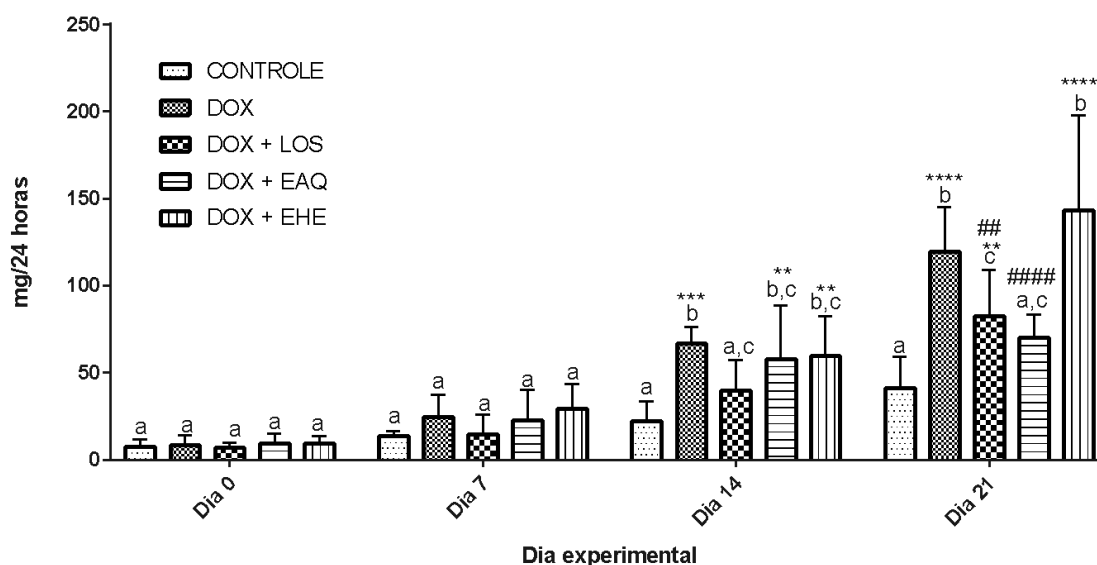
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média (A) ou média \pm desvio padrão (B). Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=8). *indica diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE, sendo que * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; ## indica diferença significativa em relação ao grupo DOX + EAQ ($p < 0,05$); § indica diferença significativa em relação ao grupo DOX + LOS ($p < 0,05$). DOX: doxorrubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

Em relação à proteinúria, que pode ser considerada o parâmetro mais importante no modelo avaliado, pode-se observar na **Figura 40** que, como ocorreu no experimento piloto, 7 dias após

a indução da doença há uma tendência no aumento da proteinúria de 24 horas para os grupos que receberam a doxorrubicina. No 14º dia experimental, 7 dias após a indução do modelo, observou-se aumento significativo dos níveis de proteinúria nos grupos DOX, DOX + EAQ e DOX + EHE em relação ao CONTROLE, enquanto o grupo DOX+LOS não diferiu do grupo controle, o que pode sugerir que o fármaco foi capaz de atenuar o processo de nefrotoxicidade. Por fim, no 21º dia experimental, concluiu-se que a losartana e EAQ foram capazes de diminuir a proteinúria em relação ao grupo DOX, sendo que EAQ não difere do grupo CONTROLE. Já para EHE o efeito não foi observado, o que é coerente com os demais resultados obtidos, indicando que esse extrato não apresentou atividade na recuperação da função renal.

Figura 40 – Proteinúria dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao longo do período experimental (dias 0 a 21)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

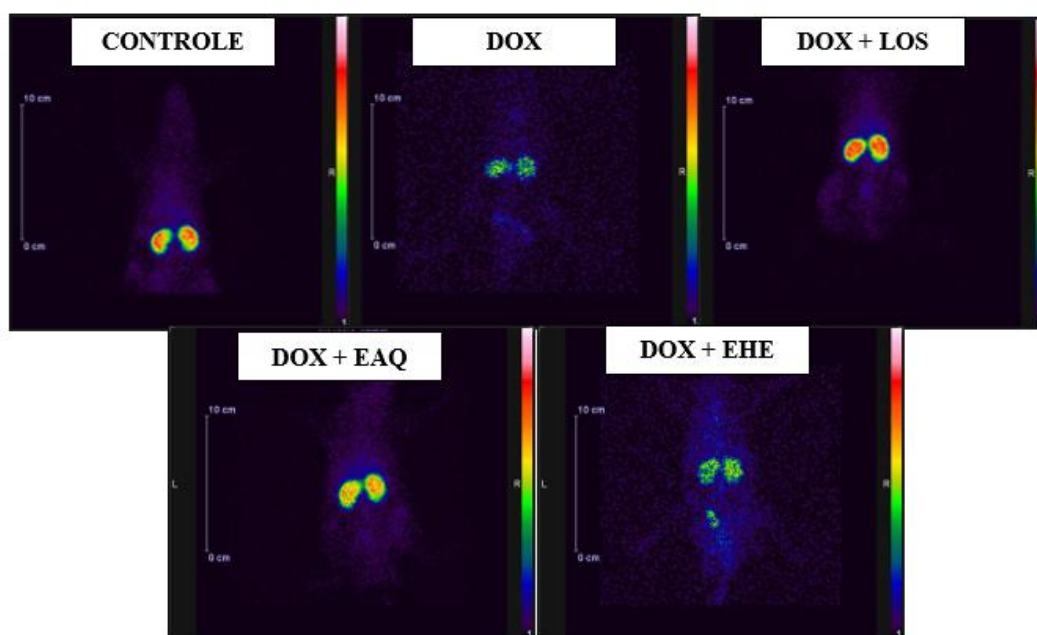
Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=8). Para cada dia experimental, letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,001$, *** indica $p < 0,001$ e **** indica $p < 0,0001$ em relação ao grupo CONTROLE. # indica $p < 0,05$, ## indica $p < 0,01$, ### indica $p < 0,001$ e #### indica $p < 0,0001$ em relação ao grupo DOX. DOX: doxorrubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

Por fim, assim como realizado para o experimento piloto, realizou-se o exame de cintilografia renal no último dia experimental (dia 21). Imagens representativas de cada grupo estão apresentadas na **Figura 41**. Observou-se diminuição da captação de $^{99m}\text{TC-DMSA}$ no grupo

DOX em relação ao grupo CONTROLE, resultado também observado para DOX + EHE. Já os grupos DOX + LOS e DOX + EAQ não diferiram do controle, apresentando ao mesmo tempo, valores mais altos de captação do radiofármaco quando comparado aos grupos DOX e DOX+EHE, o que corrobora com os dados de proteinúria, indicando recuperação da função renal nesses grupos (**Figura 42**).

Em relação à depuração da creatinina, assim como ocorreu para o experimento piloto não foi observada diferença estatística entre os grupos (**Figura 43**). A depuração de creatinina não é monitorada rotineiramente em pacientes com síndrome nefrótica em estágios mais avançados, e pacientes com SN por lesões mínimas, em geral, não apresentam alterações nesse parâmetro (BRASIL, 2021).

Figura 41 – Imagens cintilográficas obtidas para os animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)

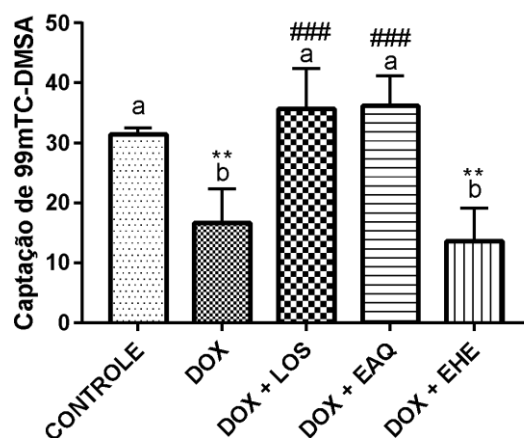


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Imagens cintilográficas obtidas para animal dos grupos: CONTROLE, DOX, DOX + LOS, DOX + EAQ e DOX + EHE. A porcentagem de captação de ^{99m}Tc -DMSA varia de forma crescente segundo a escala de cores à direita de cada imagem, sendo branco 100% e preto 0%. Condições e parâmetros para aquisição das imagens, vide item 4.8.6. DOX: doxorrubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *C. spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *C. spiralis*.

Determinou-se ainda a osmolalidade urinária e plasmática das amostras coletadas. Por meio dos resultados obtidos foi possível calcular a depuração osmolar e de água livre. Não foram encontradas diferenças estatísticas para esses parâmetros, exceto pelo aumento da osmolaridade urinária de EHE (**Tabela 8**). Encontrou-se apenas um trabalho na literatura que avaliou esses parâmetros no modelo estudado, sendo que também não foi observada variação (RUSSO, 2017). Por fim, a avaliação diária da urina por meio de fita de urinálise não forneceu qualquer informação adicional.

Figura 42 – Captação de ^{99m}Tc -DMSA obtida por cintilografia renal dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=7-8). Letras distintas indicam diferenças significativas, sendo que ** indica $p < 0,01$ em relação ao grupo CONTROLE e ### indica $p < 0,001$ em relação ao grupo DOX. DOX: doxorrubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

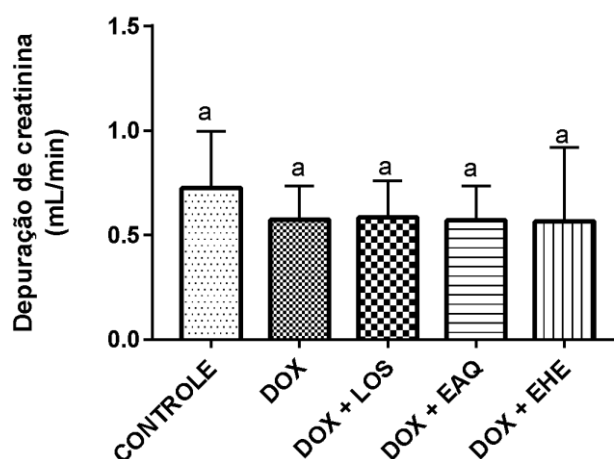
Tabela 8 – Dados de osmolalidade urinária e plasmática das amostras coletadas, depuração osmolar e de água livre no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina ao final do período experimental (dia 21)

Grupo	Osm U	Osm P	Clea. Osm.	Clea. H ₂ O
CONTROLE	1,637 ± 0,388 ^a	0,320 ± 0,040	0,049 ± 0,012	-0,029 ± 0,010
DOX	1,324 ± 0,420 ^{a,b}	0,298 ± 0,015	0,046 ± 0,011	-0,030 ± 0,015
DOX + LOS	1,605 ± 0,405 ^a	0,305 ± 0,015	0,050 ± 0,013	-0,040 ± 0,010
DOX + EAQ	1,452 ± 0,302 ^{a,b}	0,323 ± 0,026	0,038 ± 0,015	-0,029 ± 0,013
DOX +EHE	0,785 ± 0,278 ^b	0,302 ± 0,011	0,040 ± 0,019	-0,025 ± 0,017

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média ± desvio padrão. Teste: ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (n=7-8). Letras distintas indicam diferenças significativas (p< 0,05). DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

Figura 43 – Depuração de creatinina dos animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)



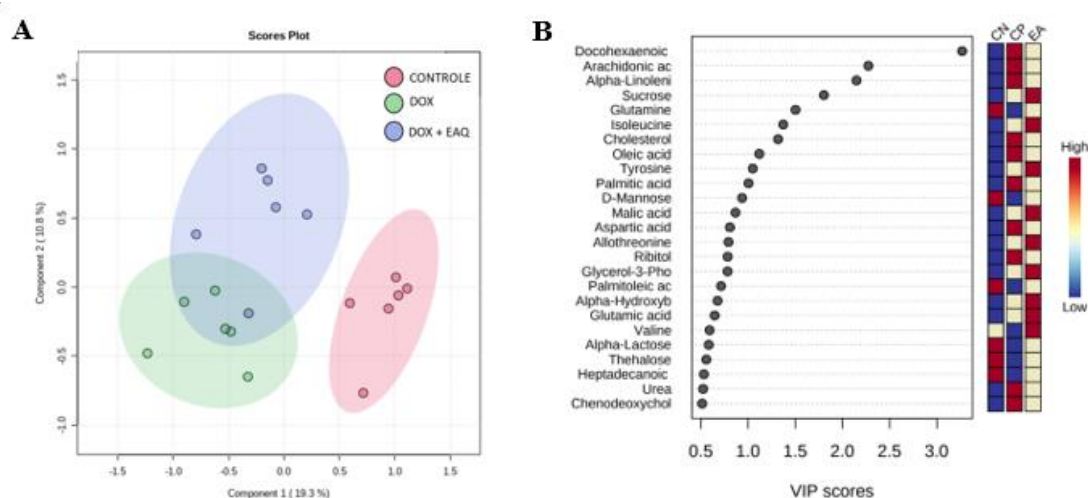
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média ± desvio padrão. Teste: ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=8). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*; EHE: extrato hidroetanólico 80% das folhas *Costus spiralis*.

A fim de compreender possíveis mecanismos de ação para EAQ, além das análises biométricas, bioquímicas e exame de cintilografia renal, realizou-se estudo de metabolômica, utilizando as amostras de plasma coletadas. Foram avaliados os grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ. A análise por CG-MS permitiu a identificação de 44 metabólitos e conforme descrito anteriormente (item 4.9.9.4) a qualidade dos resultados foi avaliada pelas amostras de CQ tendo sido considerada adequada. Os modelos gerados pelas análises multivariadas por

PCA e PLS para a análise dos quatro grupos não foram suficientemente fortes para destacar metabólitos significativos. Porém, excluindo-se o grupo DOX + LOS foi possível obter um modelo com robustez adequada (**Figura 44**). A avaliação de modelos multivariados, são avaliados pelos parâmetros de melhor ajuste do modelo (R²) e capacidade preditiva (Q²), os quais variam de 0 a 1, sendo que valores acima de 0,5 para R² e Q² indicam previsão preditiva e previsibilidade adequadas (TRIBA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2022). O modelo gerou os valores de *Variance Importante on Projection* (VIP) apresentados na **Figura 44**, os quais permitem a identificação dos metabólitos mais importantes para o modelo. Em geral, consideram-se relevantes metabólitos com valor de VIP > 1 (GALINDO-PRIETO; ERIKSSON; TRYGG, 2014; TRIBA *et al.*, 2015).

Figura 44 – PLS score plot obtidos (A) e valores de VIP (B) obtidos para análise dos grupos CONTROLE, DOX e DOX +EAQ em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

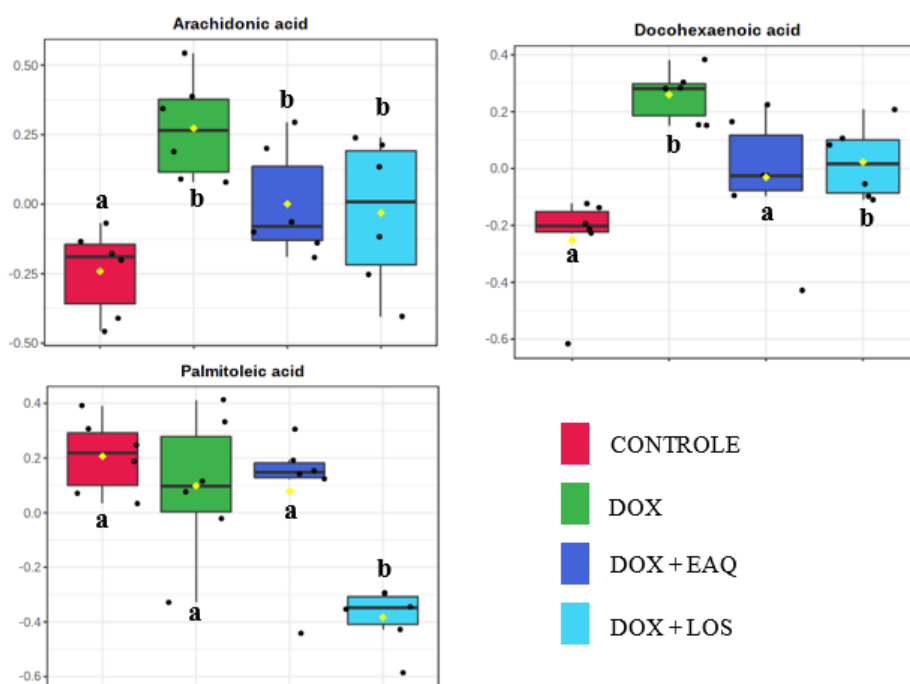
Nota: DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*. VIP: *Variance Importante on Projection*. R²= 0,96; Q² = 0,80.

Análise univariada dos dados foi empregada para determinar os metabólitos realmente significativos, encontrando-se os ácidos graxos: ácido araquidônico (ARA), ácido docosahexaenóico (DHA), ácido linoleico (ALA) e ácido palmítico. É possível observar na **Figura 45** que os níveis de ARA e DHA, dois ácidos graxos importantes nos processos fisiológicos e patológicos da inflamação, foram significativamente mais altos nos grupos DOX em

comparação ao grupo CONTROLE. Quando se exclui o grupo DOX + LOS da análise, observa-se um perfil semelhante e os níveis de ácido alfa-linolênico (ALA) apresentam-se aumentados no grupo DOX em relação ao grupo CONTROLE (Figura 46).

Dados da literatura são consistentes em afirmar que ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3 e 6, impactam no desenvolvimento e progressão de doenças renais, porém, os mecanismos envolvidos parecem ser complexos e os efeitos observados podem ser positivos ou negativos dependendo de diversos fatores. Destaca-se que muitos estudos relatam efeitos benéficos com a suplementação com DHA em pacientes renais crônicos, porém o impacto do metabolismo basal desse ácido graxo não está bem estabelecido (TUROLO *et al.*, 2018).

Figura 45 – Resultados obtidos por análise univariada dos dados de metabolômica para os grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ no modelo de síndrome de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal



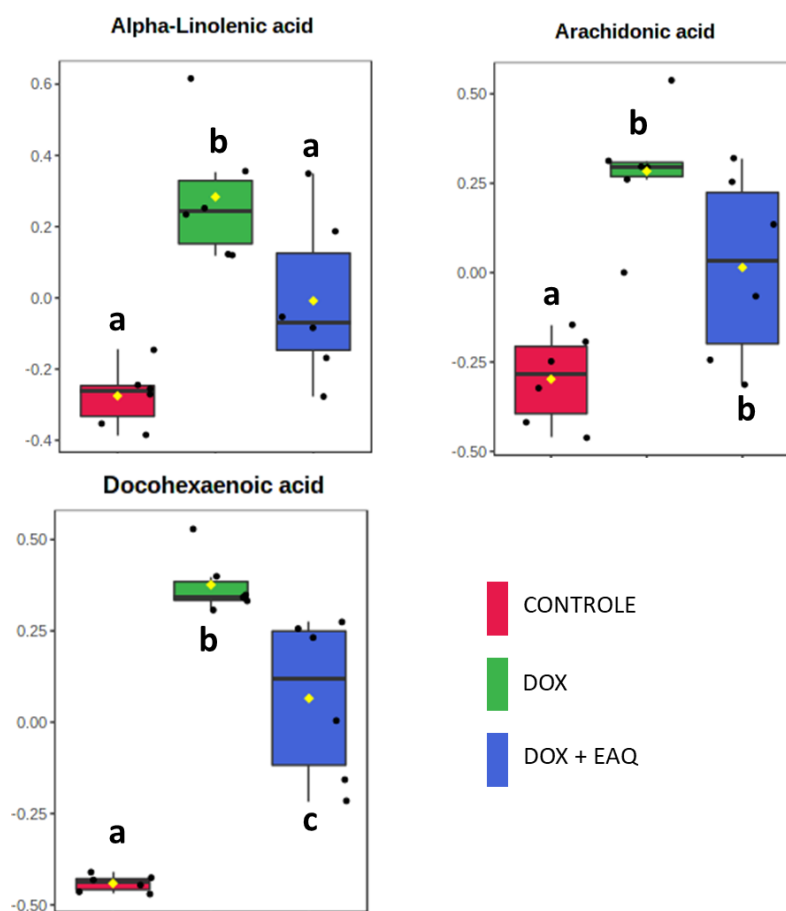
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Dados expressos como média \pm variância. Letras distintas indicam diferenças significativas. p e FDR (*False Discovery Rate*) < 0,05. DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*.

Existem na literatura outros estudos de metabolômica utilizando modelo de nefropatia induzida por doxorubicina, os quais demonstraram que a indução da doença está associada

principalmente a alterações no metabolismo energético e de aminoácidos (LI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022, 2020; ZHANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Exceto por Wang *et al.* (2022), que destacou efeito sobre essa via por meio da análise por CLUE-EM do plasma de animais avaliados no modelo estudado, os demais trabalhos não identificaram forte alteração do metabolismo desses ácidos graxos. Isso pode ser explicado pelas diferenças entre as amostras avaliadas e as plataformas de análise utilizadas. Não foram encontrados estudos que analisassem o plasma dos animais por CG-EM, como realizado no presente estudo.

Figura 46 – Resultados obtidos por análise univariada dos dados de metabolômica para os grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ no modelo síndrome de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: dados expressos como média \pm variância. Letras distintas indicam diferenças significativas. p e FDR (*False Discovery Rate*) $< 0,05$. DOX: doxorrubicina; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*.

É possível, no entanto, encontrar alguns dados clínicos de alterações do perfil de ácidos graxos em pacientes com síndrome nefrótica obtidos por meio de estudos de coorte. Os resultados, no entanto, são controversos. Aldamiz-Echevarria e colaboradores (2007), por exemplo, relatam diminuição dos níveis de ARA na síndrome nefrótica congênita, não tendo sido observados alterações nos níveis de ARA e ALA. No mesmo estudo, porém, os autores concluíram que os níveis de DHA e ARA variam de acordo com o grau de proteinúria dos pacientes. O modelo de regressão linear construído concluiu que o grau de proteinúria explica 60% da variabilidade dos valores plasmáticos desses ácidos graxos, sugerindo que os níveis podem estar maiores ou menores de acordo com o estágio da doença (ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA *et al.*, 2007).

Fujita e colaboradores (2008), por outro lado, identificaram aumento dos níveis de DHA na síndrome nefrótica por nefropatia membranosa e de ALA em paciente acometidos por síndrome nefrótica por lesões mínimas, não sendo observadas variações para ARA. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual ocorre o aumento dos níveis de ALA e DHA nesses casos não está claro, mas sugerem que o fato pode ser explicado por uma possível redução da conversão de ALA para EPA na síndrome nefrótica por lesões mínimas. Tal redução pode ser atribuída à diminuição da atividade de enzimas, desaturases e elongases. Ao contrário, na nefropatia membranosa, pode ocorrer um aumento da conversão de EPA e DHA, por aumento da atividade das mesmas enzimas (FUJITA *et al.*, 2006).

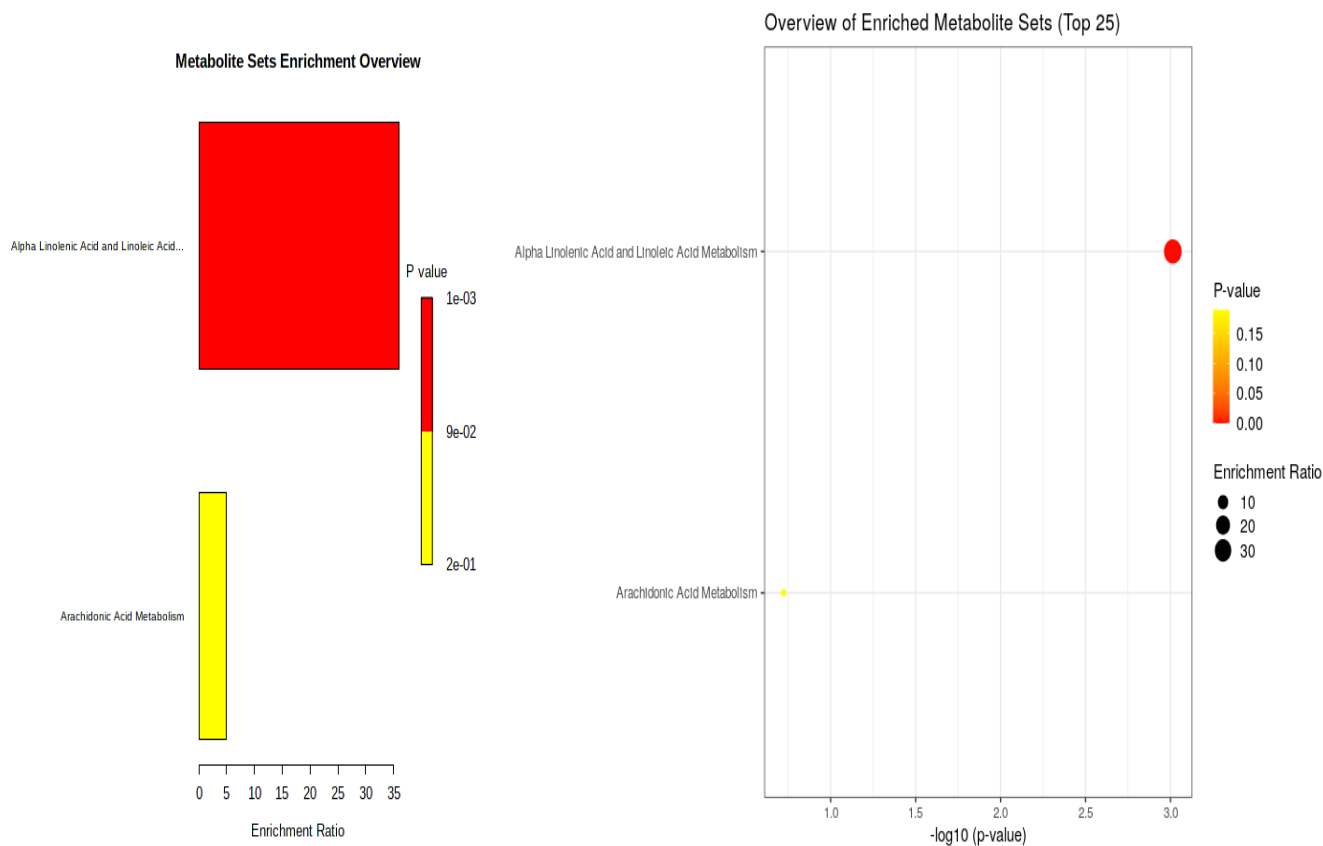
Dessa forma, é possível observar que os poucos relatos na literatura não mostram uma relação clara entre o perfil de ácidos graxos e a síndrome nefrótica. Os autores concordam, no entanto, que o perfil dessas substâncias é alterado em pacientes com diferentes formas da doença, corroborando com os resultados do presente estudo. Sugere-se que essas alterações podem estar relacionadas à piora da função renal e do processo inflamatório, e que o monitoramento dessas substâncias é desejável (TUROLO *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos neste estudo mostram uma tendência de EAQ em normalizar as alterações observadas nos níveis de DHA, ARA, ALA, tendo sido observado que houve redução significativa dos níveis de DHA em relação ao grupo DOX nos animais tratados com EAQ. Já a administração de losartana não resultou em diferenças estatísticas nos níveis desses ácidos

graxos, mas também se observa tendência de redução para DHA e ARA. Ao mesmo tempo, o fármaco teve impacto nos níveis de ácido palmitoleico, demonstrando efeito significativo no metabolismo de ácidos graxos.

A análise em conjunto dos resultados nos permite afirmar que o modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina impacta significativamente no metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados. Análise de enriquecimento de vias, a partir dos dados obtidos, mostra que as principais vias afetadas são o metabolismo do ácido linolênico e linoleico, precursores de ARA e DHA, e, em menor escala, o metabolismo do próprio ácido araquidônico (**Figura 47**). Ao mesmo tempo, EAQ parece exercer um efeito na normalização dessas alterações, e este pode ser um dos mecanismos relacionados aos efeitos na recuperação da função renal observadas para o extrato.

Figura 47 – Análise de enriquecimentos de vias obtidos para análise dos grupos CONTROLE, DOX, DOX + LOS e DOX + EAQ no modelo de nefropatia induzida por doxorubicina para avaliação do efeito de EAQ na função renal

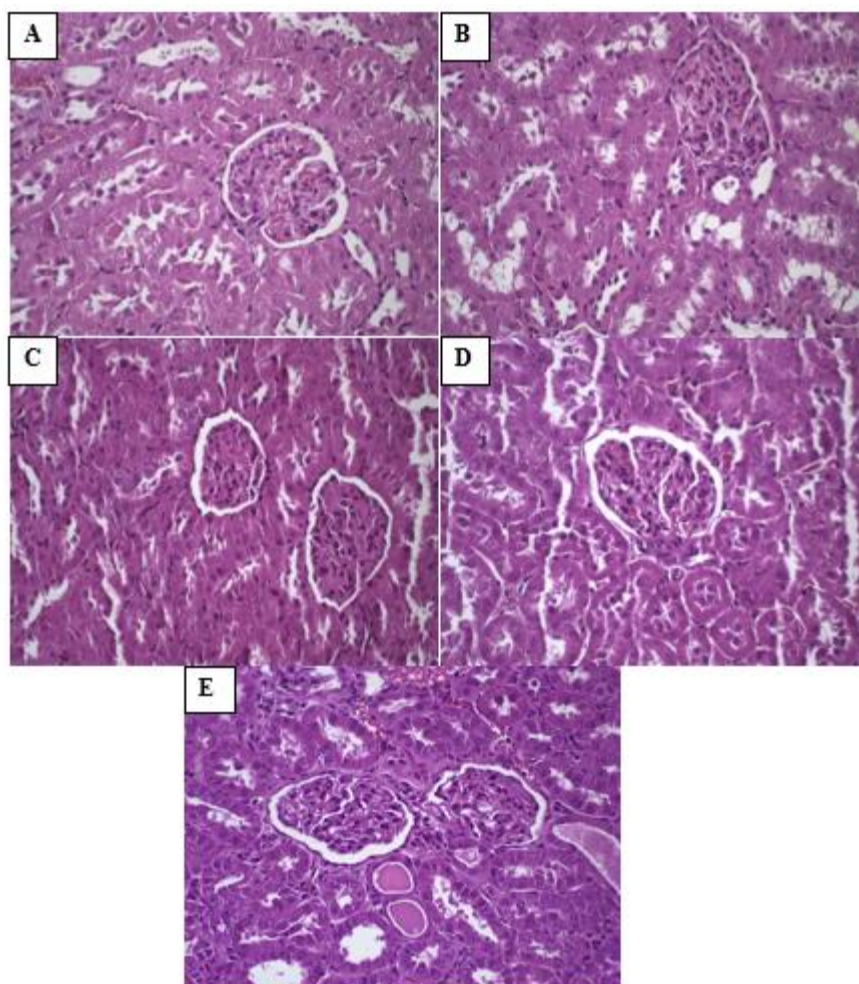


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: DOX: doxorubicina; LOS: losartana; EAQ: extrato aquoso das folhas *Costus spiralis*.

Por fim, não foi possível realizar análises de histologia renal por microscopia eletrônica para avaliação das lesões podocitárias. Espera-se obter esses dados futuramente. Não foram observadas alterações na análise histológica (**Figura 48**). A ausência de alterações histológicas por microscopia óptica é esperada nesse modelo experimental, sobretudo considerando o período avaliado. Dados da literatura científica sugerem poucas alterações histológicas nas 8 primeiras semanas após a administração da doxorubicina, sendo que a partir desse ponto, o modelo costuma evoluir para lesões mais extensas no tecido renal, com característica de glomeruloesclerose segmentar e focal e estágios avançados de DRC (RUSSO, 2017).

Figura 48 – Cortes histológicos obtidos para os animais avaliados no modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina para avaliação do efeito de EAQ e EHE na função renal ao final do período experimental (dia 21)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: Cortes histológicos de rim (ratos Wistar) dos grupos CONTROLE (A), DOX (B), DOX + EAQ (C), DOX + LOS (D) e DOX + EHE (E) corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 40x. Áreas de túbulos renais na região cortical e glomérulos. Sem evidências histológicas de alterações em todos os grupos. DOX: doxorrubicina; LOS = Losartana; EAQ = extrato aquoso de *Costus spiralis*; EHE = extrato hidroetanólico 80% de *Costus spiralis*.

Os resultados obtidos sugerem, portanto, uma potencial atividade de EAQ no tratamento de estágios iniciais da DRC, a fim de evitar ou retardar a progressão da doença, especialmente por meio da redução da proteinúria. Destaca-se que a dose avaliada, 5 mg/kg, pode ser considerada baixa, o que torna os resultados ainda mais promissores. Segundo Heinrich e colaboradores (2020) são considerados significativos os resultados de estudos farmacológicos com doses de extratos vegetais de até 200 mg/kg para extratos vegetais e 50 mg/kg para produtos naturais

puros, valores muito superiores à dose avaliada neste estudo. Na comparação com resultados prévios obtidos para derivados vegetais e substâncias isoladas no modelo estudado, esta observação é reforçada. As doses de tratamento nos estudos encontrados foram, em sua maioria, superiores a 100 mg/kg e todas maiores do que 5 mg/kg. (AFSAR *et al.*, 2020; ALASMARI *et al.*, 2022; AMARASIRI *et al.*, 2022; DUAN *et al.*, 2021; EKINCI AKDEMIR *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2017; ZAN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Um dos possíveis mecanismos de ação pode estar relacionado ao potencial anti-inflamatório dos extratos e das flavonas C-glicosiladas presentes. Os mecanismos de indução da nefropatia por doxorrubicina envolvem o aumento dos níveis de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias, incluindo NFκB (factor nuclear kappa B), TNF, interleucina (IL)-1, IL-6, IL-10 e MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos/macrófagos-1) (PEREIRA, 2013; SUTARIYA; SARAF, 2018). Existe um número significativo de relatos na literatura sobre a ação de flavonoides em geral nesses alvos terapêuticos em diferentes doenças e também no modelo avaliado (DANG *et al.*, 2021b; NAVARRO-HORTAL *et al.*, 2020; SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010). Dentre os vários flavonoides relatados nesses estudos, a apigenina, aglicona das flavonas identificadas em *Costus spiralis*, parece ter um papel de destaque, demonstrando promissora atividade anti-inflamatória em condições inflamatórias crônicas (GINWALA *et al.*, 2019). Futuramente serão realizadas análises de marcadores inflamatórios nas amostras de urina e rins obtidos no presente estudo, a fim de se obter maiores informações sobre o mecanismo de ação de EAQ.

Particularmente, em relação às flavonas presentes nas folhas de *Costus spiralis*, a vicenina-2 já demonstrou atividade na inibição de TNF em ensaios *in vitro* em concentrações entre 0,01 µg/mL e 12,0 µg/mL (KANG *et al.*, 2015; LEE; BAE, 2016; MARRASSINI *et al.*, 2011). Kang e colaboradores (2015) relataram ainda que a vicenina-2 suprimiu a hiperpermeabilidade induzida por LPS e a migração de leucócitos em camundongos, além de inibir a produção de TNF *in vitro* (KANG *et al.*, 2015). Já escafosídeo foi capaz de inibir NFκB, IL 6 e IL1 em modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em zebrafish (DANG *et al.*, 2021). Além disso, em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, EHE inibiu a produção de TNF por células THP-1 estimuladas por LPS (CASTILHO *et al.*, 2021).

Ainda sobre a atividade de flavonoides em modelo de SN induzida por doxorrubicina, estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2018) avaliaram o efeito nefroprotetor de uma fração rica em flavonoides totais obtidas de *Astragali Radix*, uma preparação fitoterápica da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) composta pela raiz seca de *Astragalus membranaceus*. A fração apresentou atividade nefroprotetora, com redução da proteinúria, que parece estar relacionada, segundo os autores, ao efeito dos metabólitos na diminuição da expressão gênica da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), aumentada pela doxorrubicina, e aumento da expressão das proteínas nefrina e podocina, reduzidas pelo quimioterápico. Os autores sugerem que a atividade nefroprotetora da fração flavonoídica estaria relacionada à regulação do sistema imunológico e do Sistema Renina Angiotensina (SRA), o que abre perspectivas para a investigação de possíveis efeitos dos flavonoides presentes em *Costus spiralis* nestes sistemas (ZHANG *et al.*, 2018).

Revisões recentes da literatura concluíram que os flavonoides têm efeitos importantes na fisiologia renal de forma geral e possuem propriedades diuréticas e natriuréticas, exercendo efeitos benéficos em diversas doenças renais, incluindo a DRC, principalmente devido aos seus efeitos nas vias inflamatórias e oxidativas (CAO *et al.*, 2022; VARGAS *et al.*, 2018). Na revisão conduzida por Vargas e colaboradores (2018) são citados estudos que demonstram a atividade de quercetina e de alguns de seus glicosídeos na redução da proteinúria. Destaca-se ainda que os flavonoides têm demonstrado propriedades antifibróticas relacionadas, por exemplo, aos efeitos dessas substâncias na via de sinalização TGF- β 1/Smad, o qual é alterada no modelo experimental de SN induzida por doxorrubicina, e é considerada um alvo terapêutico para tratamento da DRC (CAO *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos também sugerem que flavonoides tenham efeito sobre o metabolismo do ácido araquidônico e, podem, inclusive, inibir sua liberação, o que pode ser uma das explicações para os efeitos observados no estudo de metabolômica, já que EAQ mostrou uma tendência em reduzir o aumento desse ácido induzido pela doxorrubicina (SILVA *et al.*, 2002).

Dessa forma, é muito provável que os flavonoides presentes no EAQ contribuam para atividade nefroprotetora observada. Porém, o fato do mesmo efeito não ter sido observado para EHE, que apresenta concentração semelhante de flavonas C-glicosiladas em relação à EAQ, gera

questionamentos sobre o papel dessa classe de metabólitos na atividade observada no modelo de SN induzida por doxorubicina ou de sua ação em matrizes químicas diferentes. Deve-se considerar que EHE possui maior concentração de constituintes menos polares quando comparado a EAQ e que EAQ apresenta maior concentração de carboidratos.

O fato de ambos os extratos apresentarem concentrações semelhantes dos flavonoides presentes, não significa necessariamente que a mesma ação terapêutica relacionada à presença dessa classe será observada. Possíveis efeitos da matriz química podem resultar em diferentes perfis de biodisponibilidade das flavonas presentes. Vários estudos que avaliaram a farmacocinética de metabólitos especiais, incluindo flavonoides, verificaram alterações na biodisponibilidade das substâncias avaliadas quando o extrato, associações de extratos vegetais ou a substância isolada são administrados, tanto de forma a aumentar biodisponibilidade quanto prejudicá-la (LI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2019).

Além das possíveis diferenças farmacocinéticas em decorrência dos efeitos da matriz, características distintas do perfil de dissolução do derivado vegetal no trato gastrointestinal podem influenciar a biodisponibilidade dos metabólitos presentes. Os extratos apresentam características organolépticas bastante distintas e, como seria esperado, EAQ apresenta maior solubilidade em meio aquoso, sendo praticamente solúvel em solução salina nas doses avaliadas, o que não é observado para EHE.

Poucas informações são encontradas sobre a biodisponibilidade de flavonas C-glicosiladas presentes em *Costus spiralis*, mas estudo recente demonstrou que vicenina-2, escafosídeo e isoescafosídeo apresentaram boa bioacessibilidade e absorção intestinal utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Segundo os autores, o padrão de absorção dessas flavonas parece envolver múltiplas vias de transporte, incluindo transporte ativo, difusão passiva e a via paracelular (SHEN *et al.*, 2021). Considerando as hipóteses apresentadas, a investigação sobre a biodisponibilidade dessas substâncias em diferentes derivados vegetais também constituiu uma perspectiva interessante para investigação dos resultados obtidos no presente estudo.

Dessa forma, os indícios de que as flavonas C-glicosiladas presentes contribuem, ou mesmo são responsáveis pela atividade não podem ser desconsiderados. A possível influência das características de cada extrato, sobretudo a maior concentração de substâncias de menor polaridade em EHE deve ser investigada, assim como o estudo de um possível papel de carboidratos no efeito observado. Adicionalmente, a investigação de outras substâncias que foram identificadas, como taninos e saponinas, pode ser relevante dentro do fitocomplexo, embora estejam em concentrações mais baixas.

Existem diversos trabalhos na literatura científica que investigaram os efeitos renais de diferentes classes de metabólitos secundários, os quais têm apresentado resultados promissores, conforme discutido por Chen e colaboradores (2018) em uma revisão sobre o assunto. Segundo os autores, os produtos naturais têm se destacado devido à relativa conveniência e segurança de sua utilização, e demonstrado potenciais aplicações na prevenção e tratamento da DRC. Os mecanismos de ação, em geral, incluem efeitos sobre os radicais livres, vias oxidativas e inflamatórias e vias de sinalização TGF- β /Smad, conforme relatado para os flavonoides (CHEN *et al.*, 2018).

Carboidratos parecem ser substâncias relevantes nesse contexto, o que poderia explicar os resultados obtidos. Polissacarídeos já foram isolados dos caules frescos de *Costus spicatus*, espécie utilizada para os mesmos fins medicinais que os relatados para *Costus spiralis*. Os polissacarídeos isolados demonstraram potencial atividade anti-inflamatória em modelo de indução da permeabilidade vascular com ácido acético (DA SILVA; PARENTE, 2002).

Adicionalmente, dietas ricas em polissacarídeos e fibras têm demonstrado efeitos benéficos em pacientes com DRC e IRA (KHALID *et al.*, 2014; SIMÕES *et al.*, 2017). Estudo observacional demonstrou que a alta ingestão de fibras dietéticas está associada a menor mortalidade em pacientes com DRC (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2012). Segundo relatos da literatura, os mecanismos responsáveis parecem incluir o estímulo à excreção de substâncias nefrotóxicas, controle da pressão arterial e redução dos níveis plasmáticos de metabólitos nitrogenados, como creatinina, ureia e ácido úrico, que, em geral, estão aumentados em pacientes com DRC

(KHALID *et al.*, 2014). Revisão sistemática com metanálise concluiu que uma dieta rica em fibras diminui os níveis séricos de ureia e creatinina plasmática (CHIAVAROLI *et al.*, 2015).

Outro mecanismo levantado para os efeitos benéficos da administração oral de polissacarídeos e fibras seria o estímulo à produção de ácidos graxos de cadeia curta. Alguns desses ácidos graxos apresentam atividades anti-inflamatórias e anti-fibróticas, incluindo efeito na via de sinalização TGF-beta que, como já citado, é alterada no modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina e na DRC (KHALID *et al.*, 2014). Essa hipótese associada aos resultados obtidos no estudo de metabolômica conduzido no presente estudo, reforça que uma investigação mais profunda sobre o efeito de *Costus spiralis* no metabolismo de ácidos graxos pode auxiliar na compreensão dos seus mecanismos de ação.

Uma possível atividade das saponinas presentes nos extratos também pode ser considerada. Saponinas isoladas dos rizomas de *Costus spiralis* já demonstraram potencial atividade anti-inflamatória pela inibição de permeabilidade capilar induzida por administração de ácido acético em ratos (DA SILVA; PARENTE, 2004). Já saponinas isoladas dos caules de *Costus spicatus* inibiram a atividade da Na⁺ATPase no túbulo proximal de rins de cobaias, o que, segundo os autores evidenciam que o uso popular da espécie como diurético pode estar associado às saponinas presentes (SOUZA *et al.*, 2004). Relatos da literatura demonstram efeitos nefroprotetores de saponinas em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (CHEN *et al.*, 2018; SHERIF, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). A saponina esteroideal dioscina, por exemplo, apresentou atividade na supressão da inflamação e do estresse oxidativo induzidos pela doxorrubicina *in vivo* e em células epiteliais de rim de ratos (NRK-52E) (ZHANG *et al.*, 2017).

A fim de complementar os resultados apresentados, será realizada futuramente a determinação de citocinas (TNF, IL-6, IL1-beta) e quimiocinas (MCP-1, IP-10, IL-8) relacionadas à lesão glomerular nas amostras de urina obtidas no ensaio realizado. Adicionalmente, espera-se realizar a quantificação de componentes SRA (Angiotensina II, Angiotensina-(1-7), ECA e ECA2 nas mesmas amostras e a pesquisa de marcadores alternativos à depuração de creatinina para estimar o ritmo de filtração glomerular e avaliar o efeito de EAQ nesse parâmetro. Assim como investigações mais aprofundadas sobre a composição química dos extratos avaliados, a

biodisponibilidade das substâncias presentes e seu efeito sobre o metabolismo de ácidos graxos são perspectivas futuras deste estudo.

Independente das perspectivas apresentadas, o potencial de EAQ na recuperação da função renal foi demonstrado de forma satisfatória no presente estudo. A semelhança entre os perfis cromatográficos entre EAQ e decocto da espécie sugere ainda que o uso popular e tradicional se justifica. O desenvolvimento de medicamentos baseados em produtos de uso tradicional não requer estudos pré-clínicos e clínicos de eficácia e segurança, embora estes sejam altamente desejáveis. Preocupações com a segurança de EAQ podem ser minimizadas considerando os resultados de segurança pré-clínica obtidos e também o fato de EAQ ter-se mostrado ativo em dose baixa. Nesse sentido, visando à redução da utilização de animais, priorizar estudos clínicos com a espécie justifica-se considerando os resultados obtidos neste estudo.

6 CONCLUSÕES

Extratos das folhas de *Costus spiralis* ricos em flavonoides foram obtidos por maceração assistida por ultrassom, e todos os solventes avaliados foram eficientes para extração dessas substâncias. O planejamento experimental confirmou que o método extrativo avaliado é eficiente para extração dos flavonoides.

Foram desenvolvidos e validados métodos rápidos e eficientes para identificação de marcadores químicos em folhas de *Costus spiralis*. Os métodos mostraram-se seletivos e robustos. Este é o primeiro relato do desenvolvimento de um método capaz de identificação química de uma droga vegetal da espécie, o que pode contribuir com o controle de qualidade de produtos já comercializados e utilizados pela população e com a elaboração de monografias farmacopeicas para a espécie

A droga vegetal e os extratos aquoso (EAQ) e hidroetanólico 80% (EHE) foram caracterizados quimicamente. Identificou-se no extrato a presença de flavonas C-glicosiladas derivadas da apigenina, já relatadas em trabalho anterior, taninos, saponinas e carboidratos. Os extratos diferiram principalmente no teor de carboidratos totais. Investigações futuras devem ser conduzidas para determinações qualitativas e quantitativas de terpenoides, saponinas e demais fenólicos que podem estar presentes.

Obteve-se dados relativos à citotoxicidade de ambos os extratos em células HepG2 e fibroblastos 3T3-A31, pouco descritos em estudos para a espécie. Com base nestes resultados, EAQ e EHE foram submetidos a ensaios de toxicidade aguda *in vivo* e classificados na classe 5 segundo guia OECD 423, apresentando, portanto, uma alta segurança oral aguda. A análise conjunta dos dados de segurança pré-clínicos sugere uma maior segurança relativa de EAQ em relação a EHE.

A avaliação do efeito de EHE e EAQ em modelo de nefropatia induzida por doxorubicina demonstrou que EAQ apresentou atividade na redução da proteinúria, da porcentagem da massa renal em relação à massa corporal e na recuperação de lesão renal, por meio da diminuição da

captação de ^{99m}TC -DMSA em exame de cintilografia renal. Além disso, estudo de metabólômica evidenciou que o modelo interfere no metabolismo de ácidos graxos, alterando os níveis de ácido araquidônico, ácido doxo-eicosanoico e ácido alfa-linolênico, ácido alfa-linolenico, e que EAQ exerce um efeito na redução dessa alteração.

Os resultados sugerem potencial atividade de EAQ no tratamento da DRC, especialmente em seus estágios iniciais e podem ser considerados promissores uma vez que a dose ativa (5 mg/kg) pode ser considerada baixa, especialmente considerando os resultados de toxicidade pré-clínica obtidos. EHE não apresentou atividade no modelo avaliado, embora tenha apresentado resultado promissor em modelo experimental de nefrotoxicidade induzida por cisplatina *in vivo*.

Pretende-se realizar a investigação aprofundado do mecanismo de ação de EAQ por meio de dosagem de marcadores relacionados à lesão renal nas amostras de urina e rins coletadas no ensaio realizado. Estudos pré-clínicos adicionais, especialmente de genotoxicidade e toxicidade reprodutiva também podem ser importantes para garantir a segurança do uso da espécie. Espera-se que os estudos adicionais, juntamente com os resultados já obtidos, possam subsidiar as principais perspectivas do presente trabalho, as quais concentram-se no desenvolvimento farmacotécnico de uma formulação à base de EAQ apropriada à produção industrial associada a todo desenvolvimento analítico e estudo de estabilidade necessário para viabilizar a condução de estudos clínicos com a formulação desenvolvida e a produção e comercialização futuro de um fitoterápico a base de *Cotus spiralis* para doenças renais.

7 REFERÊNCIAS

- ADJÉ, Félix; LOZANO, Yves; LOZANO, Paul; ADIMA, Augustin; CHEMAT, Farid; GAYDOU, Emile. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 32, p. 439–444, 2010.
- AFSAR, Tayyaba; RAZAK, Suhail; ALMAJWAL; Ali; AL-DISI, Dara. Doxorubicin-induced alterations in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by *Acacia hydaspica* tannin-rich ethyl acetate fraction. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 27, p. 2252–2260, 2020.
- AGATI, Giovanni; AZZARELLO, Elise; POLLASTRI, Susanna; TATTINI, Massimiliano. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, [s. l.], v. 196, p. 67–76, 2012.
- AHMADIAN, Elham; SAADAT, Yalda Rahbar; ABDOLAHINIA, Elaheh Dalir; BASTAMI, Milad; SHOJA, Mohammadali; VAHED, Sepideh Zununi; ARDALAN, Mohammadreza. The role of cytokines in nephrotic syndrome. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2022, e6499668, 2022.
- AIRG-E; EKPF; ALCER; FRIAT; REDINREN; RICORS2040; SENEFRO; SET; ONT. CKD: The burden of disease invisible to research funders. **Nefrología**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 65–84, 2022.
- ALASMARI, Abdullah F.; ALI, Nemat; METAB, Alharbi; ALQAHTANI, Faleh; ALASMARI, Fawaz; ALMOQBEL, Daad; ALSWAYYED, Mohammed; ALSHAMMARI, Abdulrahman; ALANAZI, Mohammed M.; ALHOSHANI, Ali; AL-HARBI, Naif. Geraniol ameliorates doxorubicin-mediated kidney injury through alteration of antioxidant status, inflammation, and apoptosis: potential roles of NF- κ B and Nrf2/Ho-1. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 8, 2022.
- ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, Luis; VALLO, Alfredo; AGUIRRE, Mireia; SANJURJO, Pablo; GONZALEZ-LAMUÑO, Domingo; ELORZ, Javier; PRIETO, José Angel; ANDRADE, Fernando; RODRÍGUEZ-SORIANO, Juan. Essential fatty acid deficiency profile in patients with nephrotic-range proteinuria. **Pediatric Nephrology**, [s. l.], v. 22, p. 533–540, 2007.
- ALI, Tariq Zulfiqar; KHAN, Izhar; SIMPSON, William; PRESCOTT, Gordon; TOWNEND, John; SMITH, William; MACLEOD, Alison. Incidence and outcomes in acute kidney injury: A comprehensive population-based study. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 1292–1298, 2007.
- ALI, Badreldin H.; AL MOUNDHRI, Mansour S. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 1173–1183, 2006.

ALVES, Lúcio. Production of phytotherapeutics in Brazil: History, problems and perspectives. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 450–513, 2013.

AMARASIRI, Sachintha S.; ATTANAYAKE, Anoja P.; MUDDUWA, Lakmini; JAYATILAKA, Kamani. Nephroprotective mechanisms of Ambrette (*Abelmoschus moschatus* Medik.) leaf extracts in adriamycin mediated acute kidney injury model of Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 292, p. 115221, 2022.

AMORIM, Juliana Mendes; SOUZA, Larissa Camila Ribeiro de; SOUZA, Rebecca Almeida Lemos de; SILVA FILHA, Roberta da; SILVA, Juliana de Oliveira; ARAÚJO, Stanley de Almeida; TAGLITI, Carlos Alberto; SILVA, Ana Cristina Simões E; CASTILHO, Rachel Oliveira. *Costus spiralis* extract restores kidney function in cisplatin-induced nephrotoxicity model: Ethnopharmacological use, chemical and toxicological investigation. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], p. 115510, 2022.

AMORIM, Juliana Mendes. **Estudo químico e biológico para padronização de extrato de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe**: quantificação de marcadores, avaliação da citotoxicidade e efeito nefroprotetor. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

AMORIM, Juliana Mendes. **Fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe**. 2013. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

ANDERSEN, Oyvind M.; MARKHAM, Kenneth R. **Flavonoids**: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.

ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de Laboratório**: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

ANDRÉ, Thiago. **Costaceae in flora e funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110641>. Acesso em: 4 jul. 2022.

ANTUNES, Alexandre da Silva; DA SILVA, Bernadete Pereira; PARENTE, José Paz. Flavonol glycosides from leaves of *Costus spiralis*. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 507–510, 2000.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

ANVISA. **Farmacopeia brasileira**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019a.

ANVISA. Guia n. 22/2019. **Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos**. 2019b. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-e-guias/guia-22_estudos-nao-clinicos-fitoterapicos.pdf/view. Acesso em: 4 jul. 2022.

ANVISA. Instrução Normativa n. 2 de 13 de maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos

fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 maio 2014b. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf. Acesso em: 8 jul. 2022.

ANVISA. Instrução Normativa n. 4 de 11 de setembro de 2014 - Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014c. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0004_18_06_2014.pdf. Acesso em: 8 jul. 2022.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada n. 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 maio 2014a. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em: 8 jul. 2022.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada n. 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 8 jul. 2022

ARAÚJO VIEL, Tânia; DOMINGOS, Diogo; MONTEIRO, Ana Paula da Silva; LIMA-LANDMAN, M T Riggio; LAPA, Antonio J; SOUCCAR, Caden. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 193–198, 1999.

ATIQ, Ayesha; SHAL, Bushra; NAVEED, Muhammad; KHAN, Adnan; ALI, Jawad; ZEESHAN, Sara; AL-SHARARI, Shakir D.; KIM, Yeong Shik; KHAN, Salman. Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 843, p. 292–306, 2019.

ATTIQ, Ali; JALIL, Juriyati; HUSAIN, Khairana; MOHAMAD, Hazni Falina; AHMAD, Abrar. Luteolin and apigenin derived glycosides from *Alphonsea elliptica* abrogate LPS-induced inflammatory responses in human plasma. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 275, p. 114120, 2021.

AVILA-CARRASCO, Lorena; GARCÍA-MAYORGA, Elda Araceli; DÍAZ-AVILA, Daisy L; GARZA-VELOZ, Idalia; MARTINEZ-FIERRO, Margarita L; GONZÁLEZ-MATEO, Guadalupe T. **Potential therapeutic effects of natural plant compounds in kidney disease**. v. 26, n. 20, p. 6096, 2021.

AYGUN, Hatice; GUL, Serdar Savas. Protective effect of melatonin and agomelatine on adriamycin-induced nephrotoxicity in rat model: a renal scintigraphy and biochemical study. **Bratislava Medical Journal**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 113–118, 2019.

BARACUHY, José Geraldo de Vasconcelos; FURTADO, Dermeval; FRANCISCO, Paulo Roberto Megna; LIMA, José Luciano Santos de; PEREIRA, Jogerson Pinto Gomes. **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Campina Grande: EDUFPG, 2014.

BARROS NETO, Benício de; SCAMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Campinas: Bookman, 2010.

BASTOS, Marcus Gomes; KIRSZTAJN, Gianna Mastroianni. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.

BENKO-ISEPPON, Ana Maria; CROVELLA, Sergio. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from brazilian plants: state of art and perspectives. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 189–194, 2010.

BERTANI, Tulli; CUTILLO, Franca; ZOJA, Carla; BROGGINI, Massimo; REMUZZI, Giuseppe. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. **Kidney International**, [s. l.], v. 30, p. 488–496, 1986.

BEZERRA, Marcos Almeida; SANTELLI, Ricardo Erthal; OLIVEIRA, Eliane Pádua. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, [s. l.], v. 76, p. 965–977, 2008.

BIESKI, Isanete Geraldini Costa; DE LA CRUZ, Marigemma. **Quintais medicinais, mais saúde, menos hospitais**. Cuiabá: Governo do Estado de Mato Grosso, 2005.

BIKBOV, Boris *et al.* Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10225, p. 709–733, 2020.

BORRÁS, Maria Rosa Lozano. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas**. Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Valer Editora, 2003.

BRAGA, Fernão Castro. Paving new roads towards biodiversity-based drug development in brazil: lessons from the past and future perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 505–518, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos; Farmacêutica, Estratégicos. Departamento de Assistência. **A fitoterapia no SUS e o Programa de pesquisa de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **Plantas medicinais de interesse ao SUS – Renisus**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/pnppmf/ppnppmf/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-2013-renisus>. Acesso em: 4 jul. 2022.

BRASIL. **Diretrizes clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica no**

Sistema Único de Saúde. DF: Ministério da Saúde, 2014. *E-book*. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_clinicas_cuidado_paciente_renal.pdf.

BRASIL. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. DF: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 4 jul. 2022.

BRASIL. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da síndrome nefrótica primária em adultos. DF: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_sindrome_nefrotica.pdf ISBN. Acesso em: 4 jul. 2022

BREITBACH, Ulrike; NIEHUES, Michael; LOPES; Norberto P.; FARIA; Jair Eustáquio Quintino; BRANDÃO, Maria Graças Lins. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 180–189, 2013.

BUFAINO, Eliana Martino. Phytotherapy in Brazil: Recovering the concepts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 22–27, 2013.

CABUK, Mehmet; GUREL, Ahmet, SEN, Feyza; DEMIRCAN, Nejat. Renoprotective effect of erdosteine in rats against gentamicin nephrotoxicity: A comparison of 99mTc-DMSA uptake with biochemical studies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 308, n. 1–2, p. 35–42, 2008.

CAMERON, J. Stewart. The nephrotic syndrome and its complications. **American Journal of Kidney Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 157–171, 1987.

CAO, Yi Ling; LIN, Ji-Hong; HAMMES, Hans-Peter; ZHANG, Chun. Flavonoids in treatment of chronic kidney disease. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 23–65, 2022.

CARMONA, Fabio; PEREIRA, Ana Maria Soares. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 379–385, 2013.

CARVALHO, Ana Cecília Bezerra; LANA, Túlio Nader; PERFEITO, João Paulo Silvério; SILVEIRA, Dâmaris. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 212, p. 29–35, 2018.

CASTILHO, Rachel Oliveira; TAGLIATI, Carlos Albero; FARACO, André Augusto Gomes; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. **Processo para obtenção de extrato de *Costus spiralis* (jacq.) Roscoe, composições farmacêuticas e uso.** Depositante: BR 102019018453-1. Universidade Federal de Minas Gerais. Depósito: 05 setembro 2019.

CHATZIMANOUIL, Markos Kyriakos Tomidis; WILKENS, Louise; ANDERS, Hans Joachim. Quantity and reporting quality of kidney research. **Journal of the American**

Society of Nephrology, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 13-22, 2019.

CHAVES, Mariana H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “química orgânica”. **Química Nova**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 10–12, 1997.

CHAWLA, Lakhmir S.; EGGERS, Paul W.; STAR, Robert; KIMMEL, Paul L. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 371, n. 1, p. 58–66, 2014.

CHAWLA, Lakhmir S.; KIMMEL, Paul L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: An integrated clinical syndrome. **Kidney International**, [s. l.], v. 82, n. 5, p. 516–524, 2012.

CHEN, Lin; YANG, Tian; LU, De-Wen; ZHAO, Hui; FENG, Ya-Long; CHEN, Hua; CHEN, Dan-Qian; VAZIRI, Nosratola D; ZHAO, Ying-Yong. Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 101, p. 670–681, 2018.

CHEN, Dan Qian; HU, He-He; WANG, Yan-Ni; FENG, Ya-Long; CAO, Gang; ZHAO, Ying-Yong. Natural products for the prevention and treatment of kidney disease. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 50, p. 50–60, 2018.

CHIAVAROLI, Laura; MIRRAHIMI, Arash; SIEVENPIPER, John; JENKINS, David; DARLING, Pauline. Dietary fiber effects in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], p. 761–768, 2015.

CORREA, Manuel Pio. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 6 v.ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal., 1984.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1982.

CUNHA, Francisco A. B.; MATIAS, Edinardo F. F.; BRITO, Samuel V.; FERREIRA, Felipe S.; BRAGA, João Marcelo A.; COSTA, José G. M.; COUTINHO, Henrique D. M. *In vitro* antibacterial, phototoxic, and synergistic activity of ethanol extracts from *Costus cf. arabicus* L. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 964–968, 2011.

CUNHA, Francisco A. B.; Edinardo F. F.; BRITO, Samuel V.; FERREIRA, Felipe S.; BRAGA, João Marcelo A.; COSTA, José G. M.; COUTINHO, Henrique D. M. Phytochemical screening, antibacterial activity and invitro interactions between *Costus cf. arabicus* L. with UV-A and aminoglycosides. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 380–386, 2012.

DA SILVA, Bernadete Pereira; BERNARDO, Robson; PARENTE, José Paz. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 87–92, 2000.

DA SILVA, Bernadete Pereira; PARENTE, José Paz. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 239–242, 2002.

DA SILVA, Bernadete Pereira; PARENTE, José Paz. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus spiralis*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, [s. l.], v. 59c, p. 81–85, 2004.

DA SILVEIRA, Kátia Daniela; BARROSO, Livia Corrêa; VIEIRA, Angélica Thomáz; CISALPINO, Daniel; LIMA, Cristiano Xavier; BADER, Michael; ARANTES, Rosa Maria Esteves; SANTOS, Robson Augusto Souza dos; SIMÕES-E-SILVA, Ana Cristina; TEIXEIRA, Mauro Martins. Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) mas receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, 2013.

DANG, Jiao; PAUDEL, Yam Nath; YANG, Xueliang; REN, Qingyu; ZHANG, Shanshan; JI, Xiuna; LIU, Kechun; JIN, Meng. Schaftoside suppresses pentylenetetrazol-induced seizures in zebrafish via suppressing apoptosis, modulating inflammation, and oxidative stress. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 13, p. 2542–2552, 2021.

DATAPLAMT. *Costus spiralis*. 2019. Disponível em: <http://www.dataplant.org.br/v3-novaversao-block/#/planta/?idPlanta=200>. Acesso em: 17 jun. 2022.

DE AGUIAR, Lilian Kelen; PRADO, Rogerio Ruscitto; GAZZINELLI, Andrea; MALTA, Deborah Carvalho. Factors associated with chronic kidney disease: Epidemiological survey of the national health survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s. l.], v. 23, p. 1–15, 2020.

DE ALMEIDA, Evandro Moreira; FERREIRA, Hugo Jefferson; ALVES, Daniela Ribeiro; SILVA, Wildson Max Barbosa da. Therapeutic potential of medicinal plants indicated by the Brazilian public health system in treating the collateral effects induced by chemotherapy, radiotherapy, and chemoradiotherapy: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, [s. l.], v. 49, e102293, 2020.

DE ARAÚJO, Francielle Paulina; OLIVEIRA, Paulo Eugênio. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 61–70, 2007.

DE CÓGÁIN, Mitra R.; LINNES, Michael P.; KIM, Sung-Hoon; LIESKE, John C. Aqueous extract of *Costus spiralis* Roscoe inhibits calcium oxalate crystal growth and adhesion to renal epithelial cells. **Journal of Urology**, [s. l.], v. 200, n. 3, p. 824–824, 2011.

DE CÓGÁIN, Mitra R.; LINNES, Michael P.; LEE, Hyo Jung; KRAMBECK, Amy E.; UCHÔA, Julio Cezar de Mendonça; KIM, Sung-Hoon; LIESKE, John C. Aqueous extract of *Costus arabicus* inhibits calcium oxalate crystal growth and adhesion to renal epithelial cells. **Urolithiasis**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 119–124, 2015.

DE FARIAS SILVA, Diego; BEZERRA, Pedro Henrique Simões; RIBEIRO, Leonardo Lopes de Sousa; VIANA, Max Denisson Maurício; LIMA, Alyne Almeida de; SILVA NETO, Geraldo José da; TEIXEIRA, Claudener Souza; MACHADO, Sônia Salgueiro; MOREIRA, Magna Suzana Alexandre; DELATORRE, Plínio; CAMPESATTO, Eliane Aparecida; ROCHA, Bruno Anderson Matias. *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves fractions have potential to reduce effects of inflammatory diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.],

v. 268, 2020, 2021.

DE FÁTIMA PEREIRA, Wagner; BRITO-MELO, Gustavo Eustáquio Alvim; GUIMARÃES, Fábio Tadeu Lourenço; CARVALHO, Thiago Guimarães Rosa; MATEO, Elvis Cueva; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: A review of clinical and experimental studies. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 1–12, 2014.

DE LA CRUZ, Mari Gemma. **Plantas Mediciniais do Mato Grosso: a farmacopeia popular dos raizeiros**. Cuiabá: Carlini & Caniato, 2008.

DE MELO, Giany O.; MUZITANO, Michelle F; LEGORA-MACHADO, Alexandre; ALMEIDA, Thais A.; OLIVEIRA, Daniela B. de; KAISER, Carlos R.; KOATZ, Vera Lucia G.; COSTA, Sônia S. C-glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation. **Planta Medica**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 362–363, 2005.

DE OLIVEIRA, Ana Paula; Juliana S. Coppede, Bianca W. Bertoni, Antônio E. M. Crotti, Suzelei C. França, Ana Maria S. Pereira, Silvia H. Taleb-Contini. *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe: A Novel Source of Flavones with α -Glycosidase Inhibitory Activity. **Chemistry and Biodiversity**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–6, 2018.

DE SOUSA, Wendel C.; PAZ, Andressa T.S.; ROCHA, Jamira; CONCEIÇÃO EDEMILSON C. da; ALMEIDA, Luciane M. de; CHEN, Lee C.; BORGES, Leonardo L.; BAILÃO, Elisa F. L. C. *In vivo* assessment of cyto/genotoxic, antigenotoxic and antifungal potential of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves and stems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 1565–1577, 2018.

DEMIR, Fadime; DEMIR, Mustafa; AYGUN, Hatice. Evaluation of the protective effect of edaravone on doxorubicin nephrotoxicity by [99mTc]DMSA renal scintigraphy and biochemical methods. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 393, n. 8, p. 1383–1390, 2020.

DEMIR, Fadime; DEMIR, Mustafa; AYGUN, Hatice. Evaluation of the protective effect of paricalcitol and vitamin D3 at doxorubicin nephrotoxicity in rats with 99mTechnetium-dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy and biochemical methods. **Human and Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 274–283, 2021.

DI STASI, Luiz Claudio; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002.

DIALLO, Aldiouma; VICTOR, John C; FESER, Jodi; ORTIZ, Justin R.; KANESA-THASAN, Niranjan; NDIAYE, Moussa; DIARRA, Bou; CHEIKH, Sathie; DIENE, Djibril; NDIAYE, Tofene; NDIAYE, Assane; LAFOND, Kathryn E.; WIDDOWSON, Marc-Alain; NEUZIL, Kathleen M. Immunogenicity and safety of MF59-adjuvanted and full-dose unadjuvanted trivalent inactivated influenza vaccines among vaccine-naïve children in a randomized clinical trial in rural Senegal. **Vaccine**, [s. l.], v. 36, n. 43, p. 6424–6432, 2018.

DOS SANTOS, Antonia Thassya Lucas; MACHADO, Antonio Júdson Targino; FREITAS,

Maria Audilene de; MENEZES, Irwin Rose Alencar de; COUTINHO, Henrique Douglas Melo; CUNHA, Francisco Assis Bezerra da; LIMA E SOUZA, Djair dos Santos de; BOLIGON, Aline Augusti; OLIVEIRA, Adeliana Silva de; SILVA, Andressa de Alencar; MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana Bezerra. Phenolic composition and antifungal effect of costus cf. arabicus l against yeast of the *Candida* genus. **Letters in Drug Design & Discovery**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 502–511, 2018.

DUAN, Yanfen; ZHANG, Dongning; YE, Yan; ZHENG, Sili; HUANG, Ping; ZHANG, Fengyun; MO, Guoyan; HUANG, Fang; YIN, Qiang; LI, Jingjing; HAN, Lintao. Integrated metabolomics and network pharmacology to establish the action mechanism of Qingrekasen granule for treating nephrotic syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–18, 2021.

DUARTE, Regiane Cristina; TALEB-CONTINI, Silvia H; PEREIRA, Paulo S; OLIVEIRA, Camila F.; MIRANDA, Carlos Eduardo S.; BERTONI, Bianca W.; COPPEDE, Juliana S.; WILLRICH, Guilherme B.; CREVELIN, Eduardo J.; FRANÇA, Suzelei C.; PEREIRA, Ana Maria S. Effect of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves, methanolic extract and guajaverin on blood glucose and lipid levels in a type II diabetic rat model. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 16, n. 1, e1800365, 2018.

DUARTE, Regiane; ANDRADE, Laís; OLIVEIRA, Tércia. Revisão da planta *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe: Pluralidade em propriedades medicinais. **Revista Fitos**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2017.

DUKE, James A. **Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

EDDY, Allison A.; SYMONS, Jordan M. Nephrotic syndrome in childhood. **The Lancet**, [s. l.], v. 362, p. 629–639, 2003.

EDQM. **European Pharmacopoeia**. 10. ed. Strasbourg: 2022.

EKINCI AKDEMIR, Fazile Nur; YILDIRIM, Serkan; KANDEMIR, Fatih Mehmet; TANYELI, Ayhan; KÜÇÜKLER, Sefa; DORTBUDAK, Muhammed Bahaeddin. Protective effects of gallic acid on doxorubicin-induced cardiotoxicity; an experimental study. **Archives of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 258–265, 2021.

FOREMAN, Kyle J. *et al.* Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10159, p. 2052–2090, 2018.

FORNI, Lui G.; CHAWLA, Lakhmir; RONCO, Claudio. Precision and improving outcomes in acute kidney injury: Personalizing the approach. **Journal of Critical Care**, [s. l.], v. 37, p. 244–245, 2017.

FREIRE, Gabriel Pimenta. **Uso de plantas medicinais no tratamento de doenças renais crônicas**: revisão sistemática e meta-análise. 2020. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

FUJITA, Takeshi; NAKAMURA, Norio; KUMASAKA, Ryuichiro; SHIMADA, Michiko; MURAKAMI, Reiichi; OSAWA, Hiroshi; YAMABE, Hideaki; OKUMURA, Ken. Comparison of lipid and fatty acid metabolism between minimal change nephrotic syndrome and membranous nephropathy. **In Vivo**, [s. l.], v. 20, p. 891–894, 2006.

HIRONAKA, Fausto Haruki; ONO, Carla Raquel; BUCHPIGUEL, Carlos Alberto; Sapienza, Marcelo Tatit; LIMA, Marcos Santos. **Medicina Nuclear: princípios e aplicações**. São Paulo: Atheneu, 2012. 656p.

GALINDO-PRIETO, Beatriz; ERIKSSON, Lennart; TRYGG, Johan. Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS). **Journal of Chemometrics**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 623–632, 2014.

GAO, Chen; LIU, Chang; CHEN, Yuwei; WANG, Qingtao; HAO, Zhihui. Protective effects of natural products against drug-induced nephrotoxicity: A review in recent years. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 153, n. 1, 2021.

GARCIA, Tais Azevedo. **Fitoquímica e atividade anti-inflamatória de *Costus Spiralis* (Jacq.) Roscoe**. 2011. Dissertação (Mestrado de Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. ***Costus L.*** Checklist dataset, 2021. Disponível em: <https://www.gbif.org/>. Acesso em: 4 jul. 2022

GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. ***Costus arabicus L.*** Checklist dataset, 2021. Disponível em: <https://www.gbif.org/>. Acesso em: 4 jul. 2022

GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. ***Costus cuspidatus (Nees & Mart.)***. Checklist dataset, 2021. Disponível em: <https://www.gbif.org/>. Acesso em: 4 jul. 2022

GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. ***Costus scaber Ruiz & Pav.*** Checklist dataset, 2021. Disponível em: <https://www.gbif.org/>. Acesso em: 4 jul. 2022

GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. ***Costus spicatus (Jacq.) Sw.*** Checklist dataset, 2021. Disponível em: <https://www.gbif.org/>. Acesso em: 4 jul. 2022

GINWALA, Rashida; BHAVSAR, Raina; CHIGBU, DeGaulle I.; JAIN, Pooja; KHAN, Zafar K. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1–28, 2019.

GRUENWALD, Joerg; BRENDLER, Thomas; JAENICKE, Christof. **PDR for herbal medicines**. Montvale: Medical Economics Company, 2000.

GUTIERREZ, Gislaíne Beni. Desafios e oportunidades para o desenvolvimento de fitoterápicos inovadores no Brasil. **Revista A Flora**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 5–7, 2022. Disponível em: <https://www.revista-aflora.com.br/ano1-vol4>. Acesso em: 17 jun. 2022.

HEERSPINK, Hiddo; STEFÁNSSON, Bergur V.; CORREA-ROTTER, Ricardo; CHERTOW, Glenn M.; GREENE, Tom; HOU, Fan-Fan; MANN, Johannes; MCMURRAY, John; LINDBERG, Magnus; ROSSING, Peter; SJÖSTRÖM, David; TOTO, Roberto D.; LANGKILDE, Anna-Maria; WHEELER, David C. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 383, n. 15, p. 1436–1446, 2020.

HEINRICH, Michael; APPENDINO, Giovanni; EFFERTH, Thomas; FÜRST, Robert; IZZO, Angelo A.; KAYSER, Oliver; PEZZUTO, John M.; VILJOEN, Alvaro. Best practice in research – Overcoming common challenges in phytopharmacological research. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 246, e112230, 2020.

HENRIQUE, Jhonnathã Rerold; VENDRAMINI, Eduardo de Almeida; REIS, Romulo Dragani; MARQUES, Luis Carlos; MARCUCCI, Maria Cristina. Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil: Avaliação diagnóstica e propostas de intervenção. **Revista de Fitoterapia**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 129–136, 2014.

IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. **Bula do DMSA-TEC**. São Paulo, 2015.

JAGER, Kitty; KOVESDY, Csaba; LANGHAM, Robyn; ROSENBERG, Mark; JHA, Vivekanand; ZOCCALI, Carmine. A single number for advocacy and communication— worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. **Kidney International**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 1048–1050, 2019.

JIVISHOV, Emil; NAHAR, Lutfun; SARKER, Satyajit D. **Nephroprotective natural products**. 1. ed. [s. l.]: Elsevier Inc., 2020.

JOYCE, Emily L.; KANE-GILL, Sandra L.; FUHRMAN, Dana Y.; KELLUM, John A. Drug-associated acute kidney injury: who's at risk? **Pediatric Nephrology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 59–69, 2017.

KALANTAR-ZADEH, Kamyar; JAFAR, Tazeen H.; NITSCH, Dorothea; NEUEN, Brendon L.; PERKOVIC, Vlado. Chronic kidney disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 398, n. 10302, p. 786–802, 2021.

KANE-GILL, Sandra L.; GOLDSTEIN, Stuart L. Drug-Induced Acute Kidney Injury: A Focus on Risk Assessment for Prevention. **Critical Care Clinics**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 675–684, 2015

KANG, Hyejin; KU, Sae-Kwang; JUNG, Byeongjin; BAE, Jong-Sup. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside *in vitro* and *in vivo*. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 64, n. 12, p. 1005–1021, 2015.

KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Official Journal of the international society of Nephrology**, 2012. Disponível em: <https://kdigo.org/guidelines/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

KDIGO. KDIGO 2012 - Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Official Journal of the international Society of Nephrology KDIGO**, 2013. Disponível em: <https://kdigo.org/guidelines/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

KDIGO. KDIGO 2021 Clinical practice guideline for the management of glomerular diseases. **Official Journal of the International Society of Nephrology**, 2021b. Disponível em: <https://kdigo.org/guidelines/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

KHALID, Sami A.; MUSA, Abdelrahman M.; SAEED, Amal M.; ABUGROUN, Elsir A.; AHMED, Elamin O. Sid; GHALIB, Mohamed B.; ELNIMA, Elamin I.; ALKARIB, Suaad Y.; ABDELSALAM, Tagelsir Mustafa; ABDELGADER, Abdelmagid; PHILLIPS, Glyn O.; PHILLIPS, Aled O. Manipulating dietary fibre: Gum Arabic making friends of the colon and the kidney. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 71–76, 2014.

KIM, Da Rae; LEE, Shin Yeong; KIM, Jin Sug; KIM, Yang Gyun; MOON, Ju-Young; LEE, Sang Ho; LEE, Tae Won; IHM Chun Gyoo; JEONG, Kyung Hwan. Ameliorating Effect of Gemigliptin on Renal Injury in Murine Adriamycin-Induced Nephropathy. **Biomed Research International**, [s. l.], v. 2017, e7275109, 2017.

KLEIN, Traudi; LONGHINI, Renata; BRUSCHI, Marcos Luciano; MELLO, João Carlos. Fitoterápicos: Um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.

KO, Richard. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, [s. l.], v. 37, n. 697–708, 1993.

KOVESDY, Csaba P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. **Kidney International Supplements**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 7–11, 2022.

KRISHNAMURTHY, Vidya M. Raj; WEI, Guo; BAIRD, Bradley C.; MURTAUGH, Maureen; CHONCHOL, Michel B.; RAPHAEL, Kalani L.; GREENE, Tom; BEDDHU, Srinivasan. High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. **Kidney International**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 300–306, 2012.

LEAF, David E; WAIKAR, Sushrut S. Kidney end points for clinical trials in acute kidney injury. **HHS Public Access**. [s. l.] v. 69, n.1, p. 108-116, 2017.

LEE, In-Chule; BAE, Jong-Sup. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside on polyphosphate-mediated vascular inflammatory responses. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 65, p. 203–212, 2016.

LEITE, Paula M.; CAMARGOS, Layla M.; CASTILHO, Rachel O. Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, [s. l.], v. 41, p. 101270, 2021.

LEWINGTON, Andrew J.P.; CERDÁ, Jorge; MEHTA, Ravindra L. Raising awareness of acute kidney injury: A global perspective of a silent killer. **Kidney International**, [s. l.], v.

84, n. 3, p. 457–467, 2013.

LI, Ai-Ping; YANG, Liu; ZHANG, Li-Chao; HE, Sheng-Sheng; JIA, Jin-Ping; 4, QIN, Xue-Mei. Evaluation of injury degree of adriamycin-induced nephropathy in rats based on serum metabolomics combined with proline marker. **Journal of Proteome Research** [*s. l.*], v. 19, n. 7, p. 2575-2584, 2020.

LI, Chi Lin; CHENG, Yung-Yi; HSIEH, Chen-Hsi; TSAI, Tung-Hu. Pharmacokinetics of schizandrin and its pharmaceutical products assessed using a validated LC–MS/MS method. **Molecules**, [*s. l.*], v. 23, n. 1, 2018.

LI, Timao; SINGAL, Pawan K. Adriamycin-Induced Early Changes in Myocardial Antioxidant Enzymes and Their Modulation by Probucol. **Circulation**, [*s. l.*], v. 102, n. 17, p. 2105–2110, 2000.

LIMA, Ângela. **Índice Terapêutico Fitoterápico: ervas medicinais**. Petrópolis: Epub Editora, 2008.

LIU, Meifang; YANG, Qianchun, HUA, Qiaoli; LIU, Jialing; HE, Weifeng; NIU, Di; LIU, Xusheng. Chinese medicinal herbs for idiopathic membranous nephropathy in adults with nephrotic syndrome A systematic review of effectiveness and safety. **Medicine**, [*s. l.*], v. 100, n. 50, p. E27953, 2021.

LIU, Chang Shun; LIANG, Xiao; WEI, Xiao-Han; CHEN, Fei-Long; TANG, Qing-Fa, TAN, Xiao-Mei. Comparative pharmacokinetics of major bioactive components from *Puerariae Radix*-*Gastrodiae Rhizome* extracts and their intestinal absorption in rats. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [*s. l.*], v. 1105, p. 38–46, 2019.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, [*s. l.*], v. 763, p. 1–10, 2013.

LORENÇONE, Bethânia Rosa; GUARNIER, Lucas Pires; PALOZI, Rhanany Alan Callo; ROMÃO, Paulo Vitor Moreira; MARQUES, Aline Aparecida Macedo; KLIDER, Lislaine Maria; SOUZA, Roosevelt Isaias Carvalho; SANTOS, Ariany Carvalho dos; TIRLONI, Cleide Adriane Signor; CASSEMIRO, Nadla Soares; SILVA, Denise Brentan; BUDEL, Jane Manfron; GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes. Atheroprotective properties of *Costus spicatus* (Jacq.) sw. in female rats. **Life**, [*s. l.*], v. 11, n. 3, p. 1–21, 2021.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 3. ed. Nova Odessa: Jardim Botânico Plantarium, 2021.

LU, Zhenzhen; LIU, Wangyi; GAO, Hongzhi; CHEN, Wanjia; GE, Wenshu; LI, Fang; DENG, Yueyi. Traditional Chinese medicine as an adjunct therapy in the treatment of idiopathic membranous nephropathy: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 16, n. 5, 2021.

MAAS, Paul. Zingiberaceae - Zingiberioideae, Costoideae (additions). **Flora Neotropica**, [s. l.], v. 18, p. 162–218, 1977.

MABRY, Tom J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of the flavonoids**. Heidelberg: Springer Berlin, 1970.

MARRASSINI, Carla; DAVICINO, Roberto; ACEVEDO, Cristina; ANESINI, Claudia; GORZALCZANY, Susana; FERRARO, Graciela. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *urtica circularis*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 1503–1507, 2011.

MENDE, Christian W. Chronic Kidney Disease and SGLT2 inhibitors: A review of the evolving treatment landscape. **Advances in Therapy**, [s. l.], v. 39, p. 148–164, 2022.

MIRALDI, Elisabetta; BAINI, Giulia. Medicinal plants and health in human history: from empirical use to modern phytotherapy. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 7–12, 2019.

MORENO, Karyne Garcia Tafarelo; GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes; SANTOS, Ariany Carvalho Dos; PALOZI, Rhanany Alan Calloi; GUARNIER, Lucas Pires; MARQUES, Aline Aparecida Macedo; ROMÃO, Paulo Vitor Moreira; LORENÇONE, Bethânia Rosa; CASSEMIRO, Nadla Soares; SILVA, Denise Brentan; TIRLONI, Cleide Adriane Signor; BARROS, Márcio Eduardo de. Nephroprotective and antilithiatic activities of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.: Ethnopharmacological investigation of a species from the Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 266, 2021.

MUKHERJEE, Pulok K.; BAHADUR, Shiv; HARWANSH, Ranjit K.; BISWAS, Sayan; BANERJEE, Subhadip. Paradigm shift in natural product research: traditional medicine inspired approaches. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 803–826, 2017.

MUÑOZ, Maydelin; RINCÓN, Jaimar; PEDREAÑEZ, Adriana; VIERA, Ninoska; HERNÁNDEZ-FONSECA, Juan P.; MOSQUERA, Jesús. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 404–412, 2011.

NASCIMENTO, Orlando; MALDONADO, José; ARNÓBIO, Adriano. Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do comércio exterior. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 233–246, 2015.

NAVARRO-HORTAL, María D.; VARELA-LÓPEZ, Alfonso; ROMERO-MÁRQUEZ, José M.; RIVAS-GARCÍA, Lorenzo; SPERANZA, Lorenza; BATTINO, Maurizio; QUILES, José L. Role of flavonoids against adriamycin toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 146, e111820, 2020.

NERBASS, Fabiana B.; LIMA, Helbert do Nascimento; THOMÉ, Fernando Saldanha; VIEIRA NETO, Osvaldo Merege; Lugon, Jocemir Ronaldo; SESSO, Ricardo. **Censo Brasileiro de Diálise 2020**, [s. l.], p. 1–9, 2021. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/jbn/a/3Jts9Jdpcy5vc5MFjdMwV3g/?format=pdf&lang=pt>.

NEUWALD, Elisa Barp. **Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de morfologia) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 83, n. 3, 2020.

NOBLE, Rebecca; TAAL, Maarten W. Epidemiology and causes of chronic kidney disease. **Medicine (United Kingdom)**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 562–566, 2019.

NOONE, Damien G.; IJIMA, Kazumoto; PAREKH, Rulan. Idiopathic nephrotic syndrome in children. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10141, p. 61–74, 2018.

OECD. OECD 423. Acute Oral Toxicity, Acute Toxic Class Method. **OECD Guideline for Testing of Chemicals**, [s. l.], p. 1–14, 2001.

OECD. Test Guideline No. 129: Guidance document on using cytotoxicity test to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. **OECD Guidelines for the Testing Chemicals**, [s. l.], v. July, n. 129, p. 1–54, 2010.

OLIVEIRA, Ana Claudia Dias; ROPKE, Cristina. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, 2016.

PAES, Lucilene da Silva; MENDONÇA, Maria Sílvia; CASAS, Luana Lopes. Aspectos Estruturais e Fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 380–390, 2013.

PEREIRA, Wagner de Fátima. **Análises bioquímicas, biométricas, histológicas e imunológicas em ratos com nefropatia induzida pela doxorubicina**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, [s. l.], 2013.

PEREIRA, Wagner de Fátima; BRITO-MELO, Gustavo Eustáquio; ALMEIDA, Cayo Antônio Soares de; MOREIRA, Lázaro Lopes; CORDEIRO, Cleiton Willian; CARVALHO, Thiago Guimarães Rosa; MATEO, Elvis Cueva; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 287–301, 2015.

PICANÇO, Leide Caroline dos Santos; BITTENCOURT, José Adolfo Homobono Machado; HENRIQUES, Shayanne Vanessa Correia; SILVA, Juliane Silva da; OLIVEIRA, Juliana Maria da Silva; RIBEIRO, José Renato; SANJAY, Antony-Babu; CARVALHO, José Carlos Tavares; STIEN, Didier; SILVA, Jocivânia Oliveira da. Pharmacological activity of *Costus*

spicatus in experimental *Bothrops atrox* envenomation. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 2103–2110, 2016.

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 63, p. 1035–1042, 2000.

PIPPIN, Jeffrey W.; BRINKKOETTER, Paul T.; CORMACK-ABOUD, Fionnualla C.; DURVASULA, Raghu V.; HAUSER, Peter V.; KOWALEWSKA, Jolanta; KROFFT, Ronald D.; LOGAR, Christine M.; MARSHALL, Caroline B.; OHSE, Takamoto; SHANKLAND, Stuart J. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, [s. l.], v. 296, n. 2, 2009.

POLITIS, Stavros N.; COLOMBO, Paolo; COLOMBO, Gaia; REKKAS, Dimitrios M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy ISSN: [s. l.]**, v. 9045, n. April, p. 1520–5762, 2017.

POLITO, Maria Goretti; MOURA, Luiz Antonio Ribeiro de; KIRSZTAJN, Gianna Mastroianni. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9617 native kidney biopsies. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, [s. l.], v. 25, p. 490–496, 2010.

PRÍNCIPE, Cássia Rosalina; SPIRA, Beny. The effect of sixteen medicinal plants used in the Brazilian pharmacopoeia on the expression and activity of glutathione S -transferase in hepatocytes and leukemia cells. **Pharmaceutical Biology [s. l.]**, v. 47, n. 12, p. 1192–1197, 2009.

QUINTANS JÚNIOR, Lucindo J.; SANTANA, Marília T.; MELO, Mônica S.; SOUSA, Damião P de; SANTOS, Ivandilson S.; SIQUEIRA, Rosana S.; LIMA, Tamires C.; SILVEIRA, Gabriela O.; ANTONIOLLI, Angelo R.; RIBEIRO, Luciano A.; SANTOS, Márcio R. V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 1097–1102, 2010.

RAPA, Shara Franscesca; DI IORIO, Biagio Raffaele; CAMPIGLIA, Pietro; HEIDLAND, August; MARZOCCO, Stefania. Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease – potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 263, p. 1–26, 2020.

ROCHA, Nathália Selma Carvalho; CHAGAS, Cristian Kallahan; NUNES, Lucas dos Santos; BARROS, Renilson Castro de; TOMAZ, Jéssica Melissa de Oliveira; DOLABELA, Maria Fâni. *Costus* spp e sua relevância medicinal: Uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 8, p., 2021.

ROSENBERG, Mark E. Epidemiology, etiology, pathophysiology, and staging of chronic kidney disease. **Nephrology Secrets: Fourth Edition**, [s. l.], p. 119–129, 2019.

RUIZ-ORTEGA, Marta; RAYEGO-MATEOS, Sandra; LAMAS, Santiago; ORTIZ, Alberto; RODRIGUES-DIEZ, Raul R. Targeting the progression of chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, [s. l.], v. 16, p. 269-288, 2020.

RUSSO, Enzo Ricardo. **Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorubicina em um modelo animal.** Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

SAAD, Glauca de Azevedo; LÉDA, Paulo Henrique de Oliveira; SÁ, Ivone Manzali da; SEIXLACK, Antonio Carlos de Carvalho (org.). **Fitoterapia Contemporânea. Tradição e Ciência na Prática Clínica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

SAFDAR, Muhammad N.; KAUSAR, Tusneem; JABBAR, Saqib; Mumtaz, Amer; AHAD, Karam; SADDOZAI, Ambreen A. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 488–500, 2016.

SALEEM, Moin; BIERZYNSKA, Agnieszka. Recent advances in understanding and treating nephrotic syndrome. **F1000Research**, [s. l.], v. 6, p. 1–7, 2017.

SALES, Gabriel Teixeira Montezuma; FORESTO, Renato Demarchi. Drug-induced nephrotoxicity. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 66, n. Suppl 1, p. 82–90, 2020.

SANCHEZ-PINTO, L. Nelson; GOLDSTEIN, Stuart L.; Schneider, James B.; KHEMANI, Robinder G. Association between progression and improvement of acute kidney injury and mortality in critically ill children. **Pediatric Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 703–710, 2015.

SERAFINI, Mauro; PELUSO, Ilaria; RAGUZZINI, Anna. Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, [s. l.], v. 69, p. 273–278, 2010.

SHEN, Wei; HU, Xiaolong; NIU, Yajun; LU, Yimeng; WANG, Baolin; WANG, Hao. Bioaccessibility and absorption of flavonoid c-glycosides from *Abrus mollis* using simulated digestion, Caco-2 cell, and *in situ* single-pass perfusion models. **Planta Medica**, [s. l.], v. 87, n. 7, p. 570–580, 2021.

SHERIF, Iman O. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by triterpenoid saponin of *Terminalia arjuna*. **Clinical and Experimental Nephrology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 591–597, 2015.

SIEW, Edward D.; DAVENPORT, Andrew. The growth of acute kidney injury: A rising tide or just closer attention to detail?. **Kidney International**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 46–61, 2015.

SILVA FILHA, Roberta da; PINHEIRO, Sérgio Veloso Brant; CORDEIRO, Thiago Macedo E.; FERACIN, Victor; VIEIRA, Érica Leandro Marciano; MIRANDA, Aline Silva; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. Evidence for a role of angiotensin converting enzyme 2 in proteinuria of idiopathic nephrotic syndrome. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 1–13, 2019.

SILVA, Rosimar R. da; OLIVEIRA, Tânia T. de; NAGEM, Tanus; LEÃO, Maria A. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 2, p. 127, 2002.

SILVA, Robson Campos; BRITTO, Daniella Maria Coelho; PEREIRA, Wagner de Fátima; BRITO-MELO, Gustavo Eustáquio Alvin; MACHADO, Cristiane Tolentino; PEDREIRA, Marcelo Mattos. Effect of short- and medium-term toxicity of doxorubicin on spermatogenesis in adult Wistar rats. **Reproductive Biology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 169–176, 2018.

SIMIC, Ivana; TABATABAEIFAR, Mansoureh; SCHAEFER, Franz. Animal models of nephrotic syndrome. **Pediatric Nephrology**, [s. l.], v. 28, p. 2079–2088, 2012.

SIMIRGIOTIS, Mario J.; QUISPE, Cristina; BÓRQUEZ, Jorge; MOCAN, Andrei; SEPÚLVEDA, Beatriz. High resolution metabolite fingerprinting of the resin of *Baccharis tola* Phil. from the Atacama Desert and its antioxidant capacities. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 94, p. 368–375, 2016.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ross (org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, Amrit Pal; JUNEMANN, Anselm; MUTHURAMAN, Arunachalam; JAGGI, Amteshwar Singh; SINGH, Nirmal; GROVER, Kuldeep; DHAWAN, Ravi. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 31–44, 2012.

SINGH, Preet Amol; BAJWA, Neha; CHINNAM, Sampath; CHANDAN, Arun; BALDI, Ashish. An overview of some important deliberations to promote medicinal plants cultivation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [s. l.], v. 31, n. May, p. 100400, 2022.

SINHA, Aditi; BAGGA, Arvind. Nephrotic syndrome. **Indian Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 79, n. 8, p. 1045–1055, 2012.

SOUZA, Aloa Machado de; LARA, Lucienne da Silva; PREVIATO, Jose Osvaldo; LOPES, Aníbal Gil; CARUSO-NEVES, Celso; SILVA, Bernadete Pereira da; PARENTE, José Paz. Modulation of sodium pumps by steroidal saponins. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, [s. l.], v. 59c, p. 432–436, 2004.

SPECHT, Chelsea D. Systematics and evolution of the tropical monocot family Costaceae (Zingiberales): A multiple dataset approach. **Systematic Botany**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 89–106, 2006.

SPECHT, Chelsea D.; STEVENSON, Dennis W. A new phylogeny-based generic classification of Costaceae (Zingiberales). **Taxon**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 153–163, 2006.

SUTARIYA, Brijesh; SARAF, Madhusudan. α -asarone reduce proteinuria by restoring antioxidant enzymes activities and regulating necrosis factor κ B signaling pathway in

doxorubicin-induced nephrotic syndrome. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 318–324, 2018.

TAKAHASHI, Yuichi; IKEZUMI, Yohei; SAITOH, Akihiko. Rituximab protects podocytes and exerts anti-proteinuric effects in rat adriamycin-induced nephropathy independent of B-lymphocytes. **Nephrology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 49–57, 2017.

TOMLINSON, P. B. Phylogeny of the Scitamineae-morphological and anatomical considerations. **Evolution**, [s. l.], v. 16, p. 192–213, 1962 *apud* SPECHT, Chelsea D., 2006.

TRIBA, Mohamed N.; MOYEC, Laurence Le; AMATHIEU, ROLAND; GOOSSENS, Corentine; Bouchemal, NADIA; Nahon, Pierre; RUTLEDGE, Douglas N.; SAVARIN, Philippe. PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Molecular BioSystems**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 13–19, 2015.

TUROLO, Stefano; EDEFONTI, Alberto; SYREN; Marie Louise; MARANGONI, Franca; MORELLO, William; AGOSTONI, Carlo; MONTINI, Giovanni. Fatty acids in nephrotic syndrome and chronic kidney disease. **Journal of Renal Nutrition**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 145–155, 2018.

UCHÔA, Julio Cezar de Mendonça; CARVALHO, Rodrigo César Dantas. **Composição farmacêutica fitoterápica para uso no combate aos cálculos e afecções renais, na redução da pressão arterial e redução da glicemia**. BR 102014011477-7 A2. Publicação: 2016.

UCHÔA, Julio Cezar de Mendonça; CARVALHO, Rodrigo César Dantas. **Composição farmacêutica fitoterápica para uso no combate aos cálculos e doenças dos rins, na redução da pressão arterial e redução da glicemia**. BR 102017007554-0 A2. Publicação: 2018.

UNITED NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. New York and Geneva: International Labour Organization, 2011.

VARGAS, Félix; ROMECÍN, Paola; GARCÍA-GUILLÉN, Ana I.; WANGESTEEN, Rosemary; VARGAS-TENDERO, Pablo; PAREDES, Maria Dolores; ATUCHA, Noemí M.; GARCÍA-ESTAÑ, Joaquín. Flavonoids in kidney health and disease. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, p. 1–12, 2018.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant drug analysis**. 2. ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 1996.

WANG, Yuan; LI, Qing; DAI, Yue; Pan, Ronghua; XIA, Yufeng. Development of a LC–MS/MS method to investigate the interference of pharmacokinetics of the main constituents in *Saxifraga stolonifera*: Involvement of drug metabolism enzymes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 148, p. 128–135, 2018.

WANG, Duo; ZHAO, Xiao-Han; CUI, Yi; ZHANG, Tian-Tian; WANG, Fang; HU, Yong-Hong. Efficacy and safety of *Tripterygium wilfordii* Hook F for CKD in Mainland China: A

systematic review and meta-analysis. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 436–451, 2018.

WANG, Yunlai; FAN, Shengnan; YANG, Mo; SHI, Gaoxiang; HU, Siyao; YIN, Dengke; ZHANG, Yazhong; XU, Fan. Evaluation of the mechanism of Danggui-Shaoyao-San in regulating the metabolome of nephrotic syndrome based on urinary metabonomics and bioinformatics approaches. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 261, n. May, 2020.

WANG, Chunliu; LIANG, Jiping, YANG, Wenwen, WANG, Shixiang, YU, Jie, JIA, Pu, DU, Yapeng, WANG, Mei, LI, Ye, ZHENG, Xiaohui. Ultra-Performance liquid chromatography-q-exactive orbitrap-mass spectrometry analysis for metabolic communication between heart and kidney in adriamycin-induced nephropathy rats. **Kidney and Blood Pressure Research**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 31–42, 2022.

WISHART, David; FEUNANG, Yannick Djoumbou; MARCU, Ana; GUO, An Chi; LIANG, Kevin; VÁZQUEZ-FRESNO, Rosa; SAJED, Tanvir; JOHNSON, Daniel; LI, Carin; KARU, Naama; SAYEEDA, Zinat; LO, Elvis; ASSEMPOUR, Nazanin; BERJANSKII, Mark; SINGHAL, Sandeep; ARNDT, David; LIANG, Yonjie; BADRAN, Hasan; GRANT, Jason; SERRA-CAYUELA, Arnau; LIU, Yifeng; MANDAL, Rupa; NEVEU, Vanessa; PON, Allison; KNOX, Craig; WILSON, Michael; MANACH, Claudine; SCALBERT, Augustin. **The Human Metabolome Database (HMDB)**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://hmdb.ca/>. Acesso em: 30 maio 2021.

WOSCH, Luma; SANTOS, Kely Cristina dos; IMIG, Daniela Cristina; SANTOS, Cid Aimbiré M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 40–49, 2017.

XIAO, Yi; XIN, Lei; LI, Lujia; LI, Guowen; SHI, Xiufeng; JI, Guang; MI, Jinxia; Xie, YAN. Quercetin and kaempferol increase the intestinal absorption of isorhamnetin coexisting in *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson (Elaeagnaceae) extracts via regulating multidrug resistance-associated protein 2. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 53, p. 154–162, 2019.

XU, Jie; JOHNSON, Alan Kim; THUNHORST, Robert L. Thirst and sodium appetite in rats with experimental nephrotic syndrome. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 149, p. 317–323, 2015.

ZAMBELLI, Clarissa Martins Saraiva Figueira; GONÇALVES, Rodrigo Costa; ALVES, Juliana Tepedino Martins. Diretriz BRASPEN de Terapia Nutricional no Paciente com Doença Renal. **Braspen Journal**, [s. l.], v. Supl2, n. 2, 2021.

ZAN, Jun-Feng; SHEN, Chan-Juan; ZHANG, Li-Ping; LIU, Yan-Wen. Effect of *Poria cocos* hydroethanolic extract on treating adriamycin-induced rat model of nephrotic syndrome. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 916–922, 2017.

ZHANG, La; YANG, Lihong; SHERGIS, Johannah; ZHANG, Lei; ZHANG, Anthony Lin; GUO, Xinfeng; QIN, Xindong; JOHNSON, David; LIU, Xusheng; LU, Chuanjian; XUE, Charlie Changli; MAO, Wei. Chinese herbal medicine for diabetic kidney disease: A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. **BMJ Open**, [s.

l.], v. 9, n. 4, p. 1–13, 2019.

ZHANG, Wang Ning; YANG, Liu; HE, Sheng-Sheng; QIN, Xue-Mei; LI, Ai-Ping. Metabolomics coupled with integrative pharmacology reveal the protective effect of FangjiHuangqi Decoction against adriamycin-induced rat nephropathy model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [*s. l.*], v. 174, p. 525–533, 2019.

ZHANG, Wang Ning; LI, Ai-Ping; QI, Yan-Shuang; QIN, Xue-Mei; LI, Zhen-Yu. Metabolomics coupled with system pharmacology reveal the protective effect of total flavonoids of Astragali Radix against adriamycin-induced rat nephropathy model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [*s. l.*], v. 158, p. 128–136, 2018.

ZHANG, Yimeng; XU, Youwei; QI, Yan; XU, Lina; SONG, Shasha; YIN, Lianhong; TAO, Xufeng; ZHEN, Yuhong; HAN, Xu; MA, Xiaodong; LIU, Kexin; PENG, Jinyong. Protective effects of dioscin against doxorubicin-induced nephrotoxicity via adjusting FXR-mediated oxidative stress and inflammation. **Toxicology**, [*s. l.*], v. 378, p. 53–64, 2017.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, protocolo 129/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Toxicidade aguda de extratos de *Costus spiralis*", protocolo do CEUA: 129/2019 sob a responsabilidade de Rachel Oliveira Castilho que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 01/07/2019.

Vigência da Autorização	01/07/2019 a 30/06/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	180g / 8(semanas)

Sexo	feminino
Origem	Biотório da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biотório da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biотório da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biотório da Faculdade de Farmácia da UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biотório)	
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	51
Idade	8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biотório da Faculdade de Farmácia da UFMG

Considerações posteriores:

01/07/2019	Aprovado na reunião do dia 01/07/2019. Validade: 01/07/2019 a 30/06/2024
------------	--

Belo Horizonte, 03/01/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@pppq.ufmg.br

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, protocolo 233/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade nefroprotetora de *Costus spiralis* em modelo experimental de nefropatia induzida por doxorrubicina", protocolo do CEUA: 233/2018 sob a responsabilidade de Rachel Oliveira Castilho que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/08/2018.

Vigência da Autorização	06/08/2018 a 05/08/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	180g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6

Idade	8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG

Considerações posteriores:

09/05/2022	Pedido de Adendo Aprovado na reunião ordinária online do dia 09/05/2022. Adendo aprovado para o aumento do n experimental de 6 para 8 animais para todos os grupos experimentais.
06/08/2019	Adendo aprovado na reunião do dia 05/08/2019, com a inclusão de um grupo experimental de 6 ratos Wistar. Validade permanece a mesma
07/08/2018	Aprovado na reunião do dia 06/08/2018. Validade: 06/08/2018 a 05/08/2023
07/08/2018	Aprovado na reunião do dia 06/08/2018. Validade: 06/08/2018 a 05/08/2023

Belo Horizonte, 03/01/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@jomo.ufmg.br