

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

TAIS AZEVEDO GARCIA

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Costus spiralis* (Jacq.)
Roscoe**

BELO HORIZONTE – MG
2011

TAIS AZEVEDO GARCIA

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA de *Costus spiralis* (Jacq.)
Roscoe**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga

Co-orientadora: Prof^a Dra. Rachel Oliveira Castilho

Colaborador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Aos sóis que me iluminam, me aquecem e me alegram, hoje e sempre, Vinícius, Matheus, Otávio e Mariana. Amo vocês! Não há ciência que explique a força que nos une.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus real e humano presente na mente e no coração de cada pessoa que passou por minha vida e que, de alguma forma, me ajudou a completar mais esta trajetória. Parafraseando Isaac Newton, “se fui capaz de ver mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes”. A estes gigantes toda minha gratidão...

Ao meu marido, Vinícius, pelo amor incondicional, compreensão, carinho, incentivo e cumplicidade.

Aos meus filhos. Que o Deus presente nos corações deles os ajude a entender minhas ausências e perdoar minhas falhas.

Aos meus irmãos, Tânia, Telma, Ronem e Renam, pelo incentivo e por se alegrarem com minhas escolhas.

À minha mãe, pelo exemplo de força feminina e por entender minhas ausências.

Aos meus sobrinhos, sobrinhas, cunhados, cunhadas e sogra, pelo apoio e compreensão.

À Professora Rachel que, muito além da impecável orientação, acreditou em mim e me deu apoio, incentivo e tranquilidade, principalmente nos momentos em que tudo parecia desabar. Seu bom humor e sua crença foram para mim a maior prova de que Deus me acompanhava. Muito obrigada mesmo!

Ao Professor Fernão por me acolher e me dar oportunidade de aprender sempre.

Ao Professor Marcio pela paciência com que me ensinou a trabalhar com os animais e por me introduzir no fascinante mundo da Farmacologia.

À Juliana pela dedicação, ajuda e imensa competência no auxílio à realização dos ensaios. Muito obrigada!

Aos meus colegas da Fitoquímica, Ana Bárbara, Bruna, Eliana, Mariana, Priscila, Rodrigo e demais, pela ajuda, pelo apoio, pela compreensão e por dividir comigo um pouco da sapiência de cada um. Em especial ao Geraldo Célio pelas “consultorias”.

Aos colegas do laboratório de Farmacologia, em especial à Adriana Godin, pelo incentivo e ajuda no trato com os animais.

A todos os funcionários da faculdade, principalmente ao Batista, Adelaide e Raquel, pela disponibilidade e alegria com que sempre me receberam.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, Meire e Elianete, por me ajudarem sempre, dividindo as tarefas e entendendo meus atrasos. O apoio de vocês foi fundamental, sem ele seria impossível conciliar tantas tarefas.

Ao Professor Dr. João Marcelo Alvarenga Braga, pesquisador associado do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro pela identificação da espécie.

Ao André Mesquita Marques pela coleta e secagem do material vegetal e pela realização dos ensaios de RMN.

A professora Maria Auxiliadora Coelho Kaplan e o professor Cleber Bomfim do NPPN/UFRJ pelos experimentos de RMN.

Ao Professor André Massensini, colega de COLTEC, pelas aulas introdutórias de Farmacologia, as quais me ajudaram a obter a pontuação necessária para admissão ao mestrado.

Aos Laboratórios Osório de Moraes Ltda pelo apoio e envio das amostras de EICS.

Seria impossível citar todos que contribuíram direta ou indiretamente. Por isso, agradeço aos incógnitos que colaboraram e peço a Deus que continue os abençoando.

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Goethe

“Uma vez que você prove o vôo, nunca mais caminhará sobre a terra sem olhar para
os céus, pois você já esteve lá, e para lá sua alma deseja voltar.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Costus spiralis (Jaçc) Roscoe (Costaceae), denominada popularmente de cana do brejo, tem uso tradicional no Brasil para o tratamento de afecções renais. A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de folhas de *C. spiralis*, frações e substância isolada do mesmo foram avaliados utilizando modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos Swiss. O extrato foi testado, *per os*, nas doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg e apresentou atividade antiedematogênica em todas as doses, confirmando o uso tradicional da espécie. O extrato etanólico seco de *C. spiralis* foi fracionado e foram obtidas as frações Hex, Hex:DCM (1:1), DCM, DCM:EtOAc (1:1), EtOAc, EtOAc:MeOH (1:1) e MeOH. As frações foram avaliadas em modelo de edema de pata induzido por carragenina, *per os*, nas doses 5, 50 e 500 mg/Kg. As frações Hex e EtOAc:MeOH (1:1) apresentaram atividade antiedematogênica. A fração EtOAc:MeOH (1:1) foi refracionada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, resultando no isolamento de um sólido denominado FLAV1. Métodos espectrométricos foram utilizados para a análise estrutural de FLAV1, e indicaram quatro flavonas isomérica possíveis: escafosídeo, isoescafosídeo, neoescafosídeo e neoisoescafosídeo. A atividade antiedematogênica de FLAV1 foi avaliada no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos Swiss, nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg, administrada via injeção intraperitoneal. Foi observada atividade anti-edematogênica nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg, sugerindo que esta flavona está relacionada com a atividade anti-inflamatória de *C. spiralis* e que, portanto, pode constituir um marcador químico para a espécie. Um método espectrofotométrico para a quantificação de flavonóides totais calculados como quercetina foi validado para extrato comercial de *C. spiralis*. O teor de flavonóides totais no extrato foi de 0,795%

Palavras chave: *Costus spiralis*, Costaceae, neoescafosídeo, neoisoescafosídeo, isoescafosídeo, escafosídeo, atividade anti-edematogênica, teor de flavonóides totais.

ABSTRACT

Costus spiralis (Jacq) Roscoe (Costaceae), popularly named “cana do brejo”, is traditionally used in Brazil to treat kidney affections. The anti-inflammatory activity of an ethanol extract from *C. spiralis* leaves, fractions and a compound isolated from it were evaluated by using a model of carrageenan-induced paw edema in Swiss mice. The extract was assayed *per os* at the doses of 10, 100 and 1000 mg/kg and presented antiedematogenic activity at all doses, thus confirming the ethnopharmacological use of the species. The crude ethanol extract from *C. spiralis* leaves was submitted to silica gel column chromatography affording fractions Hex, Hex: DCM (1:1), DCM, DCM: EtOAc (1:1), EtOAc, EtOAc: MeOH (1:1) and MeOH. The obtained fractions were assayed *per os* in the carrageenan induced paw edema model, at the doses of 5, 50 and 500 mg/kg. The Hex and EtOAc:MeOH (1:1) fractions showed antiedematogenic activity. The EtOAc:MeOH (1:1) was submitted to fractionation by reverse phase high performance liquid chromatography resulting in the isolation of a solid named FLAV1. Analyses of spectrometric data recorded for FLAV1 were compatible with four isomeric flavones: schaftoside, isoschaftoside, neoschaftoside and neoisoschaftoside. The antiedematogenic activity of FLAV1 was evaluated by using the carrageenan induced paw edema model in Swiss mice, at the doses of 0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg administered by intraperitoneal injection. FLAV 1 elicited antiedematogenic response at the higher doses (1 and 2 mg/Kg), suggesting its participation in the anti-inflammatory activity of *C. spiralis* and, therefore, that it may represent a chemical marker for the species. A spectrophotometric method was validated for the quantitative determination of total flavonoids in a commercial extract of *C. spiralis*. The extract present 0,795% of total flavonoids, expressed as quercetin.

Keywords: *Costus spiralis*, Costaceae, schaftoside, neoschaftoside, isoschaftoside, neoisoschaftoside, anti-inflammatory activity, total flavonoids content.

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

1	Tamarixetina 3-O-neohesperidosídeo	23
2	Canferídeo 3-O-neohesperidosídeo	23
3	Quercetina 3-O-neohesperidosídeo	23
4	Rutina	23
5	Quercitrina	24
6	Quercetina	24
7	Aferosídeo A	25
8	Diosgenina	25
9	Prosapogenina A de dioscina	25
10	Diosgenona	25
11	(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-rhamnopiranosil-(1→2)]-β-D-glicopiranosídeo	26
12	(3 β, 22 α, 25R)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22- metoxifurost-5-em-3-il-O-D-apio-β-D-furanosil-(1→2)-O-[6-deoxi-α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glicopiranosídeo	26
13	Metil tetracosanoato	26
14	Ácido succínico	27
15	Ácido tetracosanoico	27
16	Ácido octacosanoico	27
17	Álcoois triterpênicos de <i>Costus tonkinensis</i>	27
18	Cetonas triterpênicas de <i>Costus tonkinensis</i>	28
19	Cicloartenol	28
20	25-en-cicloartenol	28
21	Costunolídeo	28
22	Eremantina	28
23	Acetato de sesquilavandulil	29
24	β Cariofileno	29
25	Farnesol	29
26	(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	34
27	(3β,25R)-26-(β-D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxifurost-5-en-3-il O-D-apio-β-D-furanosil-(1→4)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-glicopiranosídeo	34
28	(3,5-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona 3-O-neohesperidosídeo	35
29	Canferol 3-O-neohesperidosídeo	35

30	Difenidramina	37
31	Pirilamina	37
32	Canferol	45
33	Miricetina	45
34	Luteolina	46
35	Diosmina	47
36	Hesperidina	47
37	Genisteína	47
38	Panduratina A	48
38	Hidroxipanduratina A	48

LISTA DE FIGURAS

1	Sumário da hipótese evolucionária de <i>Costaceae</i> .	21
2	Morfologia floral e reprodução de <i>Costus spiralis</i> .	33
3	Via de biossíntese dos metabólitos do ácido araquidônico e alvos moleculares de alguns fármacos anti-inflamatórios.	38
4	Principais efeitos induzidos pela interleucina 1 (IL-1) e pelo fator de necrose tumoral α (TNF α) na inflamação.	39
5	Reação da quercetina com o radical livre e produção do radical flavonoídico.	46
6	Diagrama resumido de etapas de isolamento das substâncias.	62
7	Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para extrato etanólico seco de <i>C. spiralis</i> (EECS) na avaliação de flavonoides.	75
8	Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para EECS na identificação de saponinas.	76
9	Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica do EECS na caracterização de terpenos e esteróides.	77
10	Perfil cromatográfico por CLAE-DAD para EECS.	79
11	Espectros no UV registrados pelo detector de arranjo de diodos para picos assinalados no cromatograma de EECS.	80
12	Esqueleto básico de flavonoides e seus cromóforos.	81
13	Perfis cromatográficos e espectros no UV λ 210 nm de polifenóis de referência: quercetina, rutina e canferol.	82
14	Perfis cromatográficos e espectros no UV λ 210 nm de polifenóis de referência: catequina, epicatequina, ácido gálico e ácido cafeico.	83
15	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o EECS (A) e frações Hex (B), Hex:DCM (C), DCM (D), DCM:EtOAc (E).	85
16	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o EECS (A) e frações EtOAc (B), EtOAc:MeOH (C), MeOH (D), MeOH:AcOH (E).	86
17	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD acoplado a espectrômetro de massas para EECS (A) e fração EtOAc:MeOH (1:1) (B).	87
18	Espectros +MS (A) e +MS ₂ (B) obtidos para o pico com tempo de retenção de 19,3 minutos no cromatograma de CLAE-DAD-MS registrado para EECS.	88
19	Esquema de fragmentação proposto para tamarixetina-3-O-neohesperidosídeo.	89
20	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em λ 210 nm para EECS (A), fração EtOAc:MeOH (B) e FLAV1 (C)	90
21	Espectros de varredura de absorção no UV obtido para FLAV1 frente ao aditivo de NaOMe.	91

22	Espectros de varredura de absorção no UV obtido para FLAV1 frente ao aditivo AlCl_3 .	92
23	Espectros de varredura de absorção no UV obtido para FLAV1 frente ao aditivo NaOAc	93
24	Espectro IV obtido para FLAV1	94
25	Esqueleto básico de FLAV1	95
26	Espectro RMN de ^1H de FLAV1 contendo as expansões entre δ 4,0 ppm e δ 8,0 ppm	96
27	Mapa de contornos HSQC de FLAV1 e seções expandidas	98
28	Experimento bidimensional COSY de FLAV1 (400 MHz, DMSO-d_6)	99
29	Espectro de massas obtido por EMIE para escafosídeo (A) e isoescasosídeo (B) (KITE et al., 2006) e FLAV1 (C e D) (KITE et al., 2006)	100
30	Estruturas propostas para FLAV1: 6-C- β -D-glicosil-8-C- β -L-arabinosilapigenina (neoescafosídeo) ou 6-C- β -L-arabinosil-8-C- β -D-glicosilapigenina (neoiscafosídeo).	101
31	Mecanismo de fragmentação proposto para FLAV1	101
32	Espectro de varredura no UV obtido para solução hidrometanólica do EICS sem adição de cloreto de alumínio (A) e com adição de cloreto de alumínio (B)	107
33	Curvas analíticas obtidas para a quantificação de flavonoides totais por espectrometria no UV visível em 420 nm, utilizando quercetina como padrão.	108
34	Comparação entre os teores de flavonoides totais calculados como quercetina para o EICS analisado nas condições nominais do método e em variações deliberadas de tempo de leitura, comprimento de onda e concentração da solução do reagente de complexação.	114
35	Efeito induzido pelo EECS sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos (em 5 e 24 horas).	117
36	Efeito induzido pelas frações Hex e Hex:DCM sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.	118
37	Efeito induzido pelas frações DCM, DCM:EtOAc, EtOAc sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.	119
38	Efeito induzido pelas frações EtOAc:MeOH e MeOH sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.	120
39	Efeito induzido pelo FLAV1 sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.	121

LISTA DE TABELAS

1	Alguns exemplos de substâncias de origem natural de ação anti-inflamatória	43
2	Fracionamento preliminar do EECS por cromatografia em coluna de gel sílica G 60.	59
3	Concentrações e solventes utilizados no preparo das soluções empregadas na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD.	60
4	Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis CLAE-FR-DAD para EECS e frações derivadas	60
5	Gradiente de eluição empregado no refração da fração EtOAc:MeOH e das misturas de substâncias.	62
6	Avaliação qualitativa das principais classes de metabólitos especiais no EECS	74
7	Massas e rendimentos obtidos no fracionamento preliminar de EECS.	78
8	Atribuições das principais absorções no espectro no IV do FLAV1	94
9	Dados de RMN de ^1H e correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no mapa de contornos HSQC obtido para FLAV1 e dados obtidos a partir da literatura para escafosídeo e neoescasfosídeo	102
10	Dados de RMN de ^1H e correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no mapa de contornos HSQC obtido para FLAV1 e dados obtidos a partir da literatura para isoescasfosídeo e neoisoescasfosídeo	103
11	Concentração de soluções de quercetina e respectivas absorvâncias (λ 420 nm) utilizadas para construção das curvas analíticas.	108
12	Teores de flavonoides totais em EICS expressos em quercetina obtidos na determinação de precisão intradia para o método espectrofotométrico UV VIS λ 420 nm.	110
13	Teores de flavonoides totais em EICS expressos em quercetina obtidos na determinação de precisão interdia para o método espectrofotométrico UV VIS λ 420 nm.	111
14	Resultados obtidos no teste de exatidão para determinação de flavonoides totais no EICS.	113
15	Teores de flavonoides totais expressos como quercetina para EECS e para a fração EtOAc:MeOH	116

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATPase	Grupo de enzimas que hidrolizam a adenina trifosfato
CCD	Cromatografia em camada delgada
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CMC	Carboximetilcelulose
COSY	<i>Corralation spectroscopy</i>
COX	Cicloxygenase
d.i.	Diâmetro interno
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EECS	Extrato etanólico bruto de <i>Costus spiralis</i>
EECS	Extrato etanólico seco bruto de <i>Costus spiralis</i>
eNOs	Óxido nítrico sintase endotelial
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HETE	Ácido hidroxi eicosatetraenoico
HIV	Virus humano da imunodeficiência
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Corralation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
iNOs	Óxido nítrico sintase induzível
IV	Espectrometria no Infravermelho
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MeOH	Metanol
nNOs	Óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NOs	Óxido nítrico sintase
PG	Prostaglandina
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPM	Rotações por minuto
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	Acetato de 12-O-tetradecanoil forbol
TX	Tromboxano
UV	Espectrometria no ultra-violeta/visível
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS.....	2
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	2
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1. A família Costaceae e as espécies do gênero <i>Costus</i>	20
3.1.1 Atividades biológicas das espécies do gênero <i>Costus</i>	29
3.1.2 A espécie <i>Costus spiralis</i>	31
3.2. Inflamação	35
3.2.1. Mediadores químicos do processo inflamatório	36
3.3. Atividade anti-inflamatória de substâncias de origem natural	42
3.4. Os flavonoides e sua atividade anti-inflamatória	43
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
4.1 Equipamentos	50
4.2 Materiais de consumo	51
4.2.1 Materiais diversos.....	51
4.2.2 Reagentes e solventes	51
4.2.3 Soluções e reveladores para cromatografia em camada delgada de sílica (CCD).....	52
4.2.4 Substâncias de referência	53
4.3 Coleta e identificação do material vegetal	53
4.4 Preparo do material vegetal e extração	54
4.5 Prospecção fitoquímica.....	54
4.5.1 Identificação de flavonoides	55
4.5.2 Identificação de taninos	55
4.5.3 Identificação de antracênicos.....	56
4.5.4 Identificação de naftoquinonas	56
4.5.5. Identificação de saponinas	56

4.5.6 Identificação de cumarinas	57
4.5.7 Identificação de alcaloides	57
4.5.8 Identificação de triterpenos e esteróides	57
4.5.9 Identificação de cardenolídeos.....	58
4.6 Fracionamento do extrato etanólico de <i>Costus spiralis</i> (EECS).....	58
4.7 Perfis cromatográficos por CLAE-FR de EECS e frações derivadas	59
4.8 Identificação dos flavonoides de EECS por CLAE-MS/MS.....	61
4.9 Refracionamento da fração EtOAc:MeOH	61
4.10 Caracterização das substâncias isoladas a partir da fração EtOAc:MeOH	63
4.11 Validação do método de quantificação de flavonoides totais no extrato comercial das folhas de <i>C. spiralis</i> e quantificação de flavonoides totais em EECS e na fração EtOAc:MeOH	64
4.11.1 Método de quantificação espectrométrica de flavonoides totais	65
4.11.2 Seletividade	67
4.11.3 Linearidade.....	67
4.11.4 Precisão	68
4.11.5 Exatidão	69
4.11.6 Robustez.....	70
4.11.7 Limite de quantificação	70
4.11.8 Limite de detecção.....	71
4.11.9 Quantificação de flavonoides totais em EECS e na fração EtOAc:MeOH	71
4.12 Avaliação da atividade anti-inflamatória de EECS, frações derivadas e substância isolada (FLAV1)	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Prospecção fitoquímica.....	74
5.2 Fracionamento de EECS e obtenção de perfis cromatográficos por CLAE- FR para o extrato e frações	77
5.3 Caracterização dos flavonoides de EECS por CLAE-MS/MS	87
5.4 Isolamento e caracterização das substâncias isoladas a partir da fração EtOAc:MeOH (1:1).....	89
5.5 Validação de método para quantificação de flavonoides totais em derivados da droga vegetal folhas de <i>Costus spiralis</i>	105

5.5.1 Seletividade.....	106
5.5.2 Linearidade.....	107
5.5.3 Precisão.....	109
5.5.4 Exatidão.....	111
5.5.5 Robustez.....	114
5.5.6 Limite de quantificação.....	115
5.5.7 Limite de detecção.....	115
5.5.8 Quantificação de flavonoides totais em EECS e na fração EtOAc:MeOH (1:1).....	115
5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória de EECS, frações e FLAV1	116
6 CONCLUSÕES.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
APÊNDICE.....	134

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo dinâmico, uma reação dos tecidos a um agente agressor. O processo inflamatório constitui um mecanismo defensivo muito importante contra inúmeros agressores. Resumidamente, pode-se dizer que o agente agressor atua sobre os tecidos induzindo a liberação de mediadores que promoverão aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de líquidos (exudação) e de células sanguíneas para o interstício. Em geral, terminada a ação do agente inflamatório, reduz-se a liberação dos mediadores e o estado hemodinâmico do tecido é recuperado. Se o processo causar necrose, o tecido necrosado será fagocitado e a etapa seguinte será a cicatrização ou regeneração (BRASILEIRO FILHO, 1998).

Entretanto, alguns agentes inflamatórios estimulam a liberação de mediadores por longo tempo, o que levará ao prolongamento do processo inflamatório causando desconforto ao paciente. Nestes casos, torna-se necessário o controle da inflamação com uso de medicamentos (BRASILEIRO FILHO, 1998).

Os fármacos anti-inflamatórios utilizados na terapêutica médica oficial são os anti-inflamatórios esteroides e os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs).

Os anti-inflamatórios esteróides são mais utilizados no tratamento de doenças autoimunes e na prevenção ou tratamento de rejeições em transplantes de órgãos. No entanto, o tratamento crônico com anti-inflamatórios esteroides é limitado devido à possibilidade de ocorrência de várias reações adversas (RANG et al., 2007). Entre essas, podem ser citadas síndrome de Cushing (rosto arredondado, boca estreita, obesidade do tronco com membros relativamente finos), hipertensão, hiperglicemia, fraqueza muscular, aumento da susceptibilidade à osteoporose, glaucoma, distúrbios psiquiátricos e outros (GAUTAM & JACHAK, 2009).

AINEs são fármacos amplamente utilizados e que podem induzir reações adversas graves, as quais incluem nefrotoxicidade. A principal ação dos anti-inflamatórios não esteroidais consiste em bloquear a síntese renal de prostaglandinas (PG) por meio

da inibição da cicloxigenase (COX). No tocante ao funcionamento renal, as principais prostaglandinas são a PGI₂ e a PGE₂. Estas prostaglandinas são potentes vasodilatadores e, em condições habituais, são secretadas pelos rins em quantidades muito pequenas, não desempenhando papel importante na manutenção do fluxo sanguíneo e da filtração glomerular. Porém, em condições que promovem baixo fluxo sanguíneo renal, ocorre aumento da produção de vasoconstritores renais (norepinefrina e angiotensina II). Estes vasoconstritores poderiam levar à diminuição da filtração glomerular caso não ocorresse a ação vasodilatadora das prostaglandinas. No entanto, pacientes em uso de AINEs terão a produção destas prostaglandinas reduzida, o que pode resultar em redução da função renal e, em casos extremos, insuficiência renal aguda, funcional, que pode ser reversível após suspensão da droga. Devido a esse efeito colateral, deve-se evitar o uso contínuo de AINEs (DELFINO & MOCELIN, 1995).

AINEs não seletivos também inibem a isoforma da cicloxigenase constitutivamente expressa no estômago, a COX1. A inibição da COX1 resulta no bloqueio da biossíntese da PGI₂ e PGE₂ que estão envolvidas na citoproteção gástrica, o que pode resultar em ulceração estomacal e duodenal (RANG et al., 2007).

Assim, anti-inflamatórios são fármacos importantes na terapêutica de processos inflamatórios, mas podem causar reações adversas graves. Este fato nos remete à busca por novos fármacos anti-inflamatórios de maior especificidade e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais.

Dentro das abordagens atuais para pesquisa de novos agentes anti-inflamatórios eficazes e com maior segurança estão os produtos naturais de plantas de uso tradicional.

As plantas medicinais são fontes de diversas substâncias com potencial terapêutico. O uso popular de plantas medicinais é extremamente amplo, sendo bem reconhecidas suas atividades estimulante, antidepressiva, anti-hipertensiva, calmante, sedativa, anti-inflamatória entre outras (OBUTE & ADUBOR, 2007; BRANDÃO et al., 2006). A ampla atividade das plantas medicinais deve-se aos diferentes tipos de metabólitos secundários biossintetizados. Vários desses

metabólitos apresentaram atividade anti-inflamatória devidamente comprovada cientificamente (SIMÕES et al., 2004; GAUTAM & JACHAK, 2009) e entre esses metabólitos destacam-se os flavonoides que, além da atividade anti-inflamatória, apresentam atividades antiaterosclerótica, antitumoral, antitrombogênica, antiosteoporótica e antiviral (NIJVELDT et al., 2001).

A prospecção e o estudo de plantas medicinais de uso popular no tratamento de processos inflamatórios podem nos levar a descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios com maiores eficácia e segurança que os anti-inflamatórios de uso corrente.

Dentre as inúmeras plantas utilizadas tradicionalmente no tratamento de afecções renais encontramos a *Costus spiralis* (Costaceae), também conhecida como cana do brejo ou cana de macaco. Tal espécie tem sido utilizada pela medicina popular brasileira para o tratamento de nefrites, inflamações da uretra, infecções da bexiga, cálculos renais e aterosclerose (CORREA, 1926). Outros estudos da espécie levaram ao isolamento de flavonoides em suas folhas (ANTUNES, SILVA, PARENTE, 2000). O uso tradicional da *C. spiralis* no tratamento de doenças renais aliado à presença de flavonoides em suas folhas indica que o estudo fitoquímico biomonitorado da espécie possa resultar na identificação de substâncias bioativas com ação anti-inflamatória, potenciais candidatos para o desenvolvimento futuro de fármacos ou de marcadores para a obtenção de extratos padronizados visando a produção de fitoterápicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vivo*, a atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de *Costus spiralis* Roscoe (Costaceae), de frações derivadas e de substâncias isoladas em modelo de edema de pata induzido por carragenina.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato etanólico de folhas de *C. spiralis*;
- Avaliar a potencial atividade anti-inflamatória do extrato etanólico no modelo do edema de pata em camundongos;
- Realizar o fracionamento cromatográfico preliminar do extrato e selecionar a fração mais ativa no ensaio - *in vivo* - de atividade antiedematogênica;
- Isolar as substâncias majoritárias da fração selecionada anteriormente;
- Elucidar a estrutura química das substâncias isoladas a partir de dados espectroscópicos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória das substâncias isoladas.
- Validar metodologia de quantificação de flavonoides totais calculados em quercetina para extrato comercial de *C. spiralis*.
- Quantificar o extrato etanólico de *C. spiralis* e as frações com atividade anti-inflamatória.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A família Costaceae e as espécies do gênero *Costus*

A família Costaceae era classificada como uma subfamília da grande família Zingiberaceae. Essa classificação baseava-se nas similaridades das características florais e inflorescências entre as espécies das duas famílias. Tomlinson (1962) sugeriu que essas semelhanças poderiam indicar uma ancestralidade comum e propôs a elevação de Costaceae ao status de família independente embasando sua proposta em diferenças morfológicas e anatômicas. Segundo Tomlinson (1962) a família Costaceae compreende quatro gêneros: *Costus*, *Monocostus*, *Dimerocostus* e *Tapeinochilos*.

Uma análise cladística de dados moleculares múltiplos de cloroplastos e genoma nuclear, bem como dados morfológicos, levou Specht (2006) a propor uma reclassificação para a família Costaceae. Nessa reclassificação, os gêneros *Tapeinochilos*, *Monocostus* e *Dimerocostus* foram mantidos. O gênero *Costus*, o maior de todos, foi dividido em quatro gêneros: *Cheilocostus*, *Chamaecostus*, *Paracostus* e *Costus*. A **Figura 1** apresenta um sumário da corrente hipótese evolucionária de Costaceae baseada na análise filogenética realizada por Specht (2006).

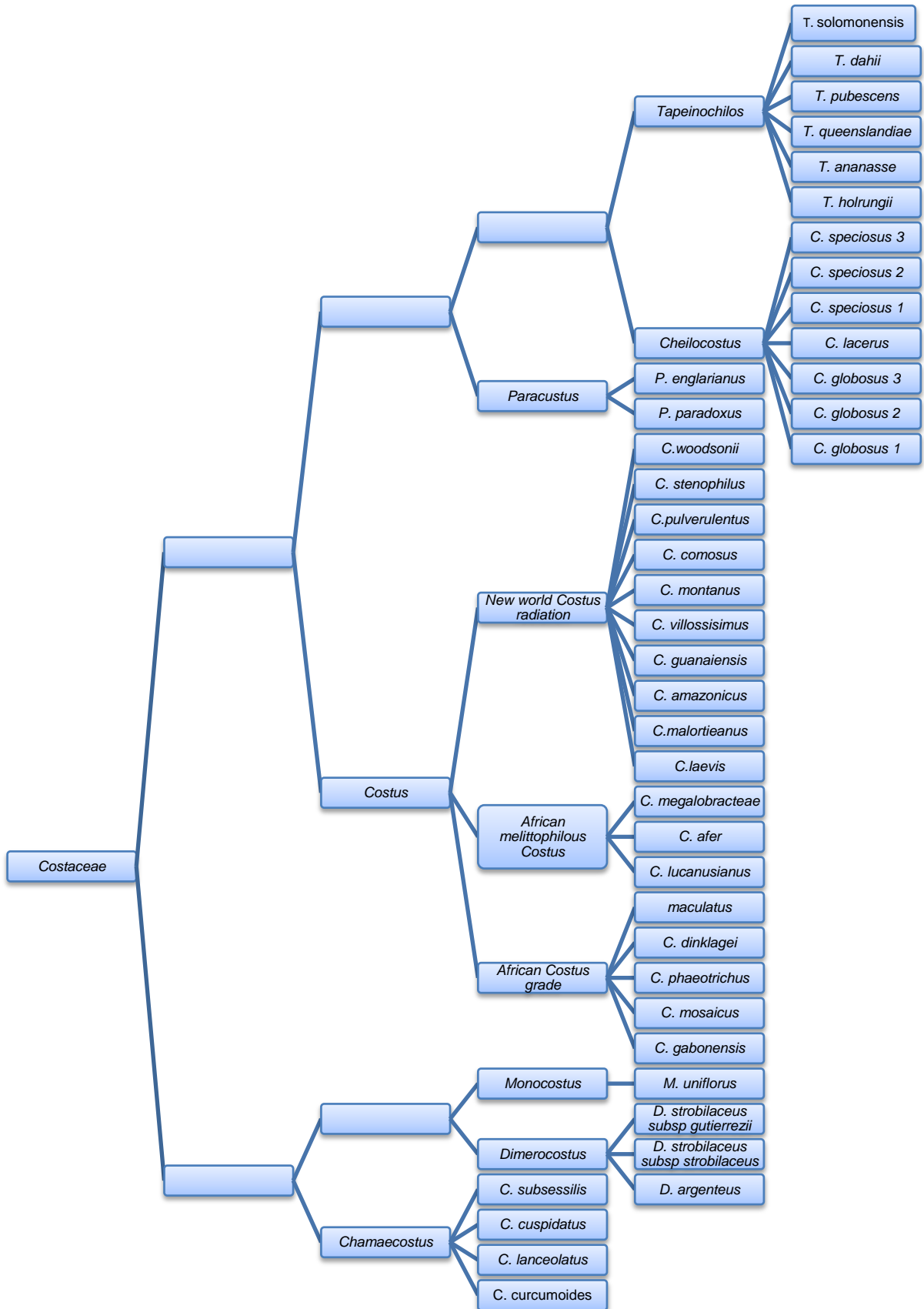


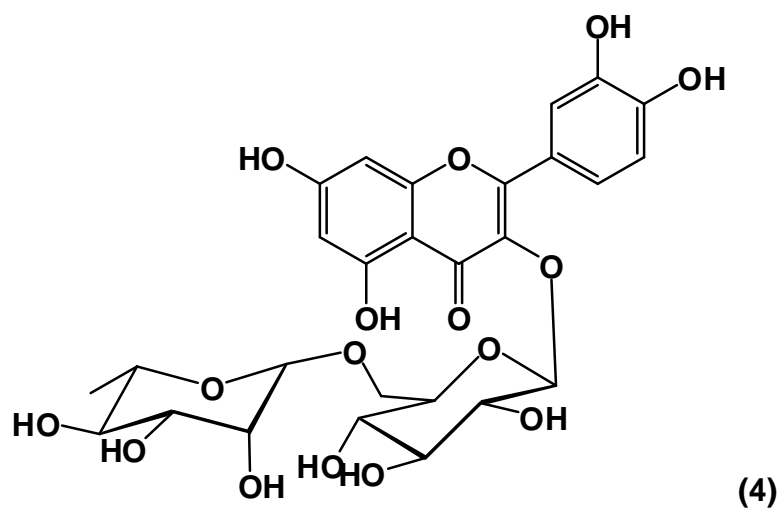
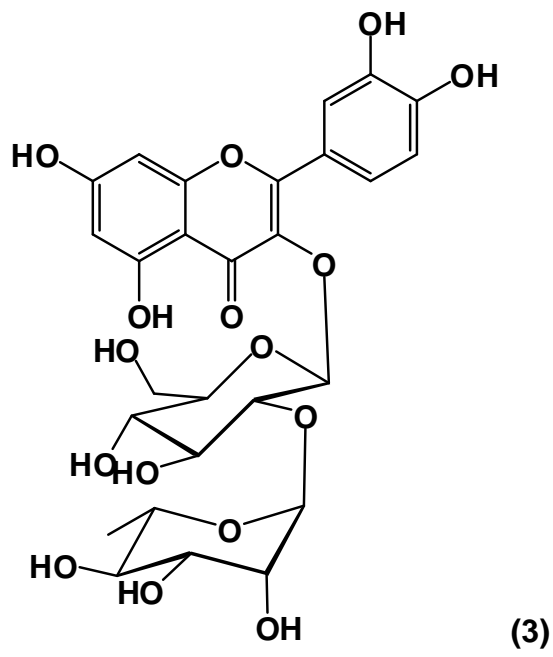
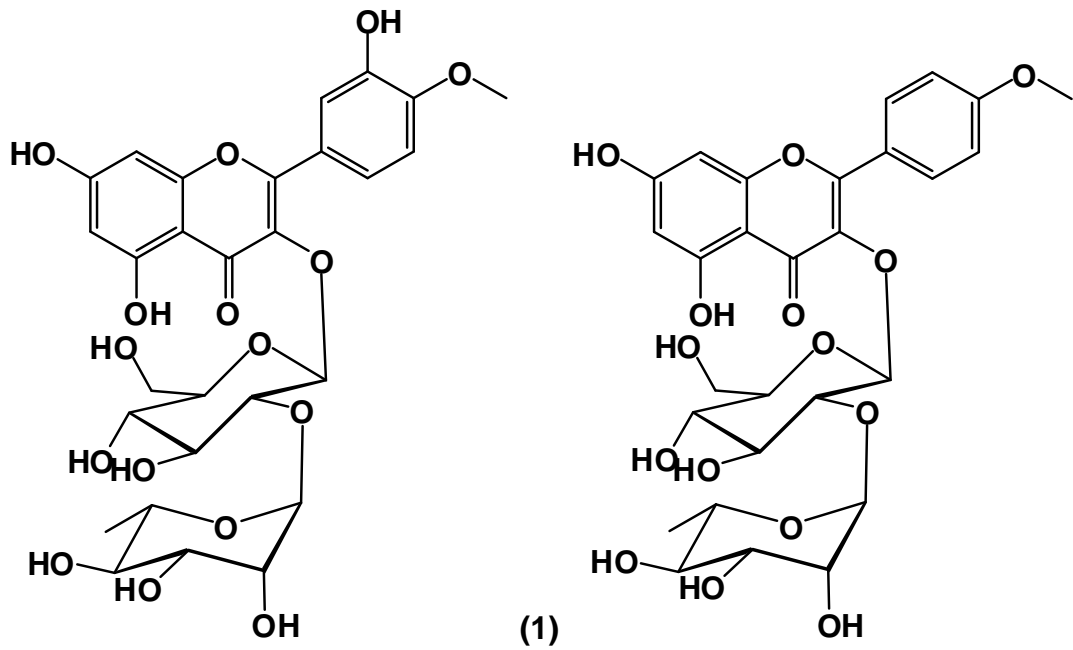
Figura 1 Sumário da hipótese evolucionária de Costaceae (SPECHT, 2006)

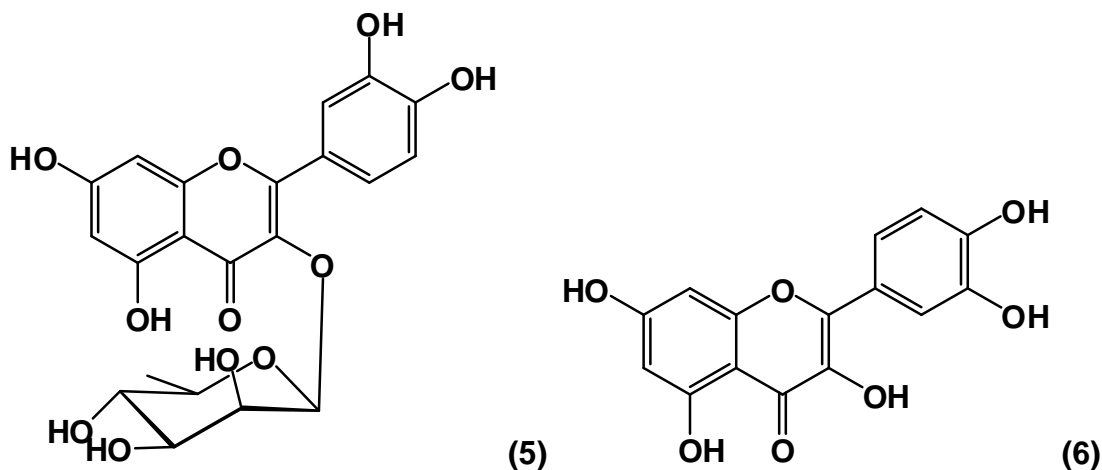
O gênero *Costus* é o maior da família Costaceae com 125-175 espécies e apresenta maior diversidade morfológica da família (ARAUJO & OLIVEIRA, 2007; SPECHT et al., 2006). Essas espécies crescem em densidades extremamente baixas, contendo, em sua maioria, ramos espirais com inflorescências terminais. Suas inflorescências produzem uma flor por dia, no máximo duas (ARAUJO & OLIVEIRA, 2007).

A recente classificação da família Costaceae e o reduzido número de trabalhos científicos sobre as espécies não permitem ainda uma visão geral da composição química das espécies do gênero. No entanto, alguns estudos anteriores possibilitam uma visão sobre os principais constituintes químicos já identificados no gênero.

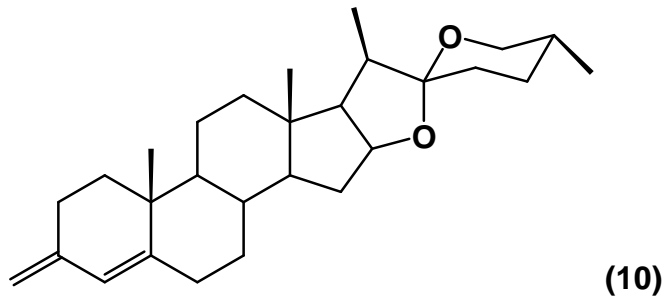
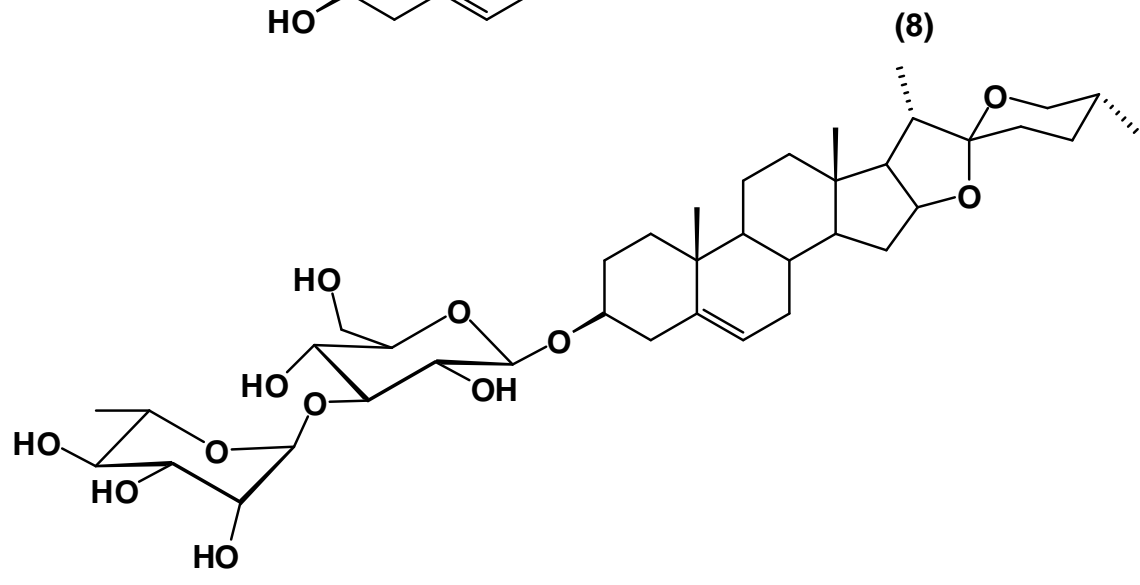
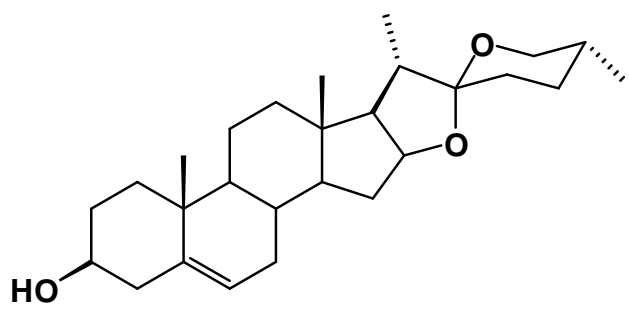
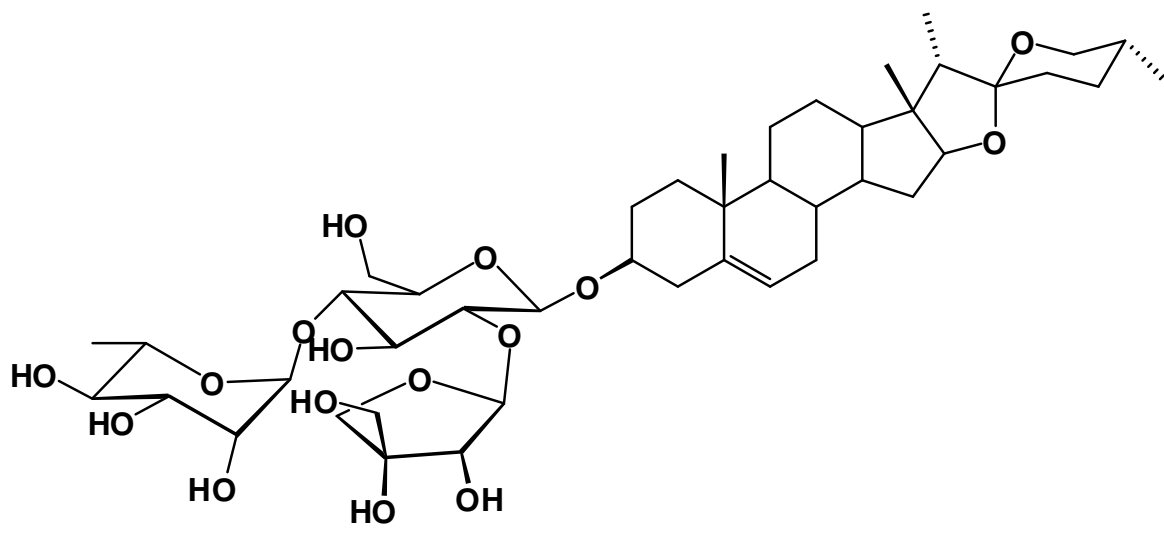
Em um estudo de revisão realizado por Williams et al. (1977), os autores relataram a presença de flavonas-C-glicosiladas em 86% das espécies pertencentes à subfamília *Costoideae*. No entanto, na nova classificação, algumas espécies da subfamília *Costoideae* foram mantidas na família Zingiberaceae e outras passaram a constituir a nova família Costaceae (SPECHT et al., 2006). Portanto, o índice de espécies contendo flavonas C-glicosiladas proposto por Williams et al. (1977) não pode ser considerado.

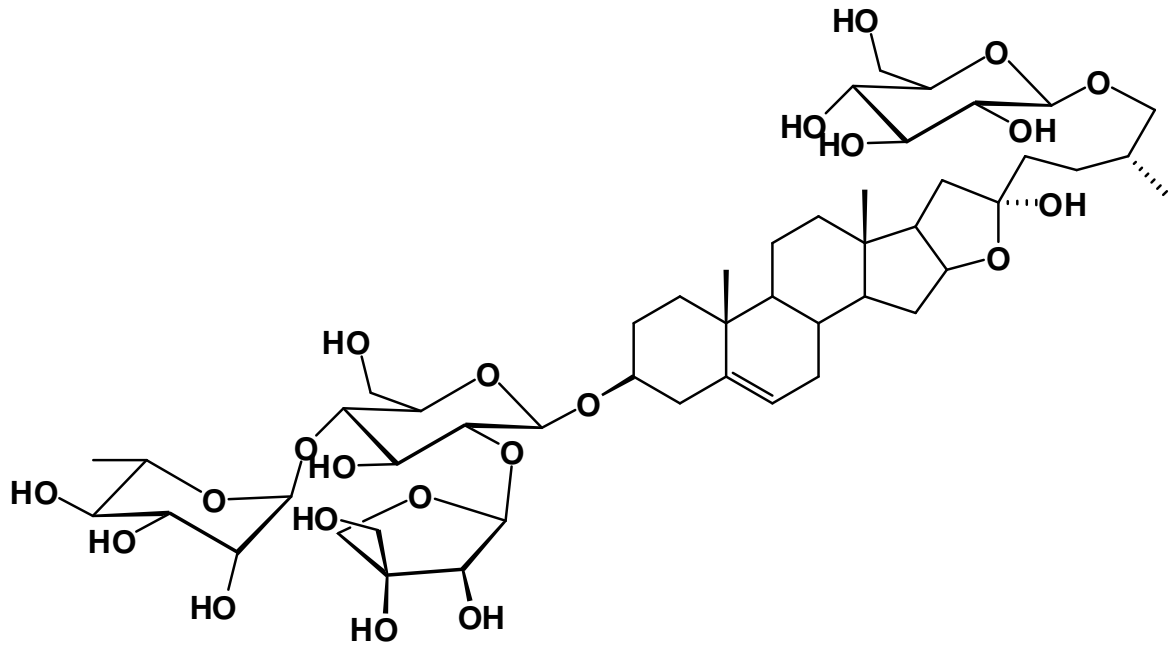
Por outro lado, existem outros estudos relatando a presença de compostos flavônicos em espécies de *Costus*. Da espécie *C. spicatus* Swartz foram isolados, a partir do extrato metanólico das folhas, dois flavonóis diglicosídicos inéditos (tamarixetina-3-O-neohesperidosídeo **(1)** e canferídeo-3-O-neohesperidosídeo **(2)**), um flavonol diglicosídeo conhecido (quercetina-3-O-neohesperidosídeo **(3)**) e outros seis flavonoides (SILVA et al., 2000). Rutina **(4)**, quercitrina **(5)** e quercetina **(6)** foram extraídas da espécie *Cheilocostus speciosus* (J. Koenig) C. Specht (**sin. Costus speciosus** (J.Koenig) Sm.) utilizando um método de extração líquida pressurizada assistida por surfactantes. Após extração, os flavonoides foram analisados por cromatografia eletrocínética micelar (CHANG et al., 2011).



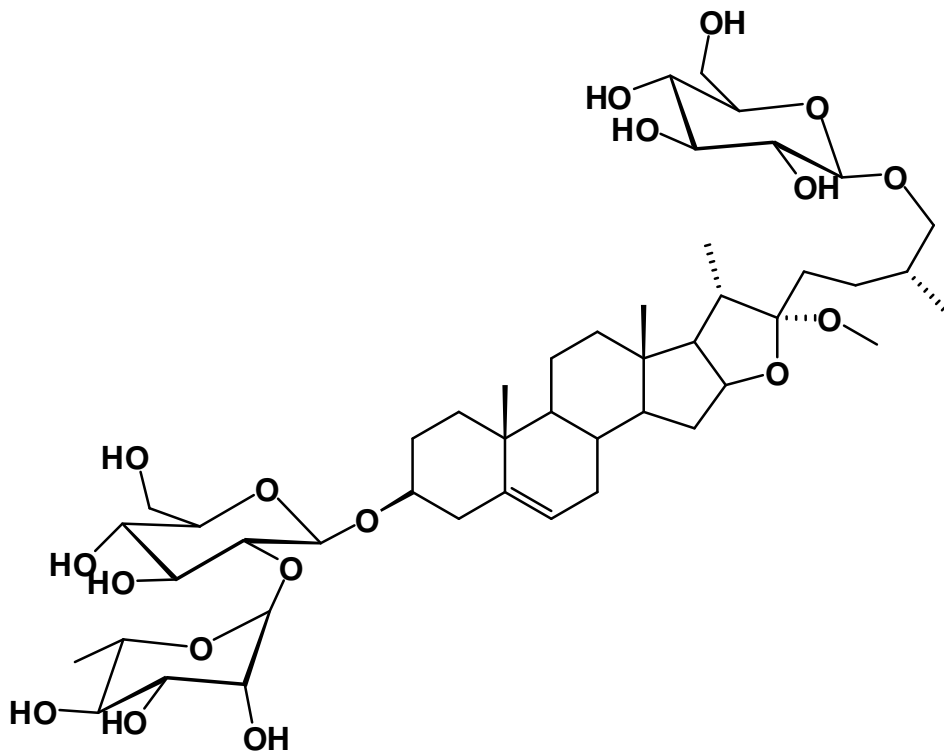


Outro grupo de metabólitos que aparecem nos resultados de vários estudos fitoquímicos envolvendo espécies da família Costaceae são as saponinas. Foram isoladas saponinas nas espécies *Costus afer* Ker-Gawl (LIN et al., 1996), *Cheilocostus speciosus* (J. Koenig) C. Specht (sin.: *Costus speciosus* J. Koenig) (INOUE et al., 1996; QIAO et al., 2002) e *Costus spicatus* Swartz (SOUZA et al., 2004; SILVA et al., 1999). Em *Costus afer* foi isolada a saponina aferosideo A **(7)**. Diosgenina **(8)**, prosapogenina B de dioscina **(9)** e diosgenona **(10)** foram isolados de *Cheilocostus speciosus* (INOUE et al., 1996; QIAO et al., 2002). As saponinas isoladas de *Costus spicatus* são (3- β ,-22- α ,-25R-)-26-(β -D-glicopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio- β -D-furanosil -(1 \rightarrow 4)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glicopiranosídeo **(11)** (SILVA et al., 1999) e (-3- β ,-22- α ,-25R-)-26-(β -D-glicopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio- β -D-furanosil-(1 \rightarrow 2)-O-[6-deoxi- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glicopiranosídeo **(12)** (SILVA et al., 1998).



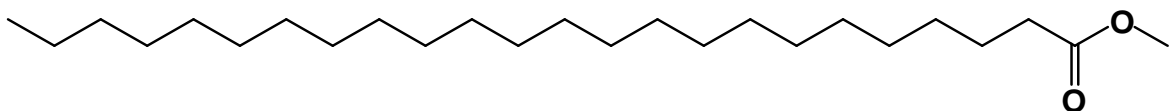


(11)



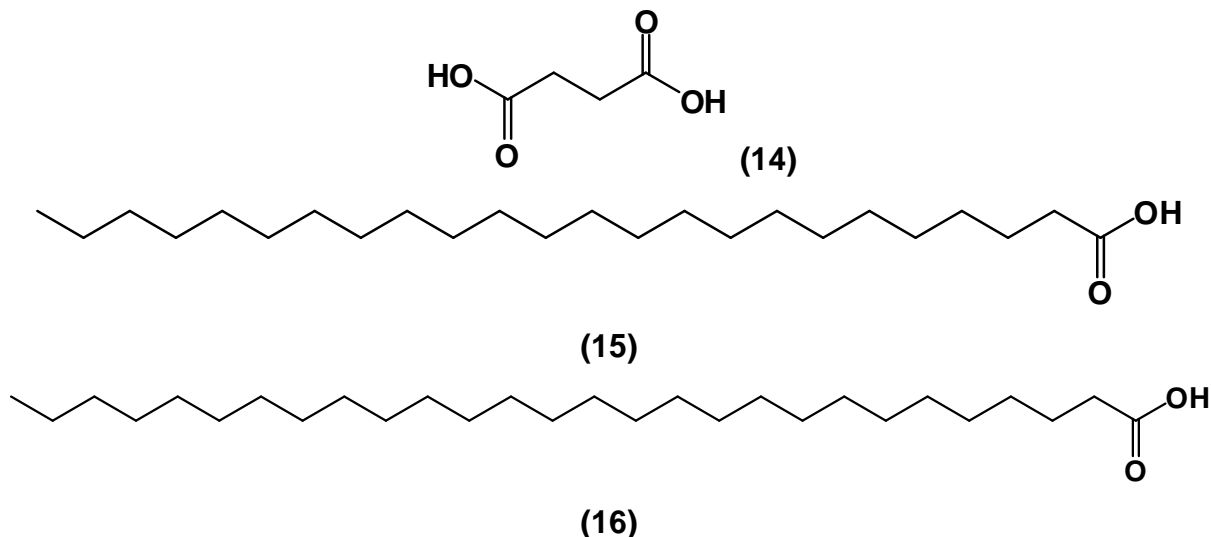
(12)

O éster tetracosanoato de metila **(13)** foi isolado do extrato metanólico de folhas de *Costus pictus* D. Don (SHILPA et al., 2009).

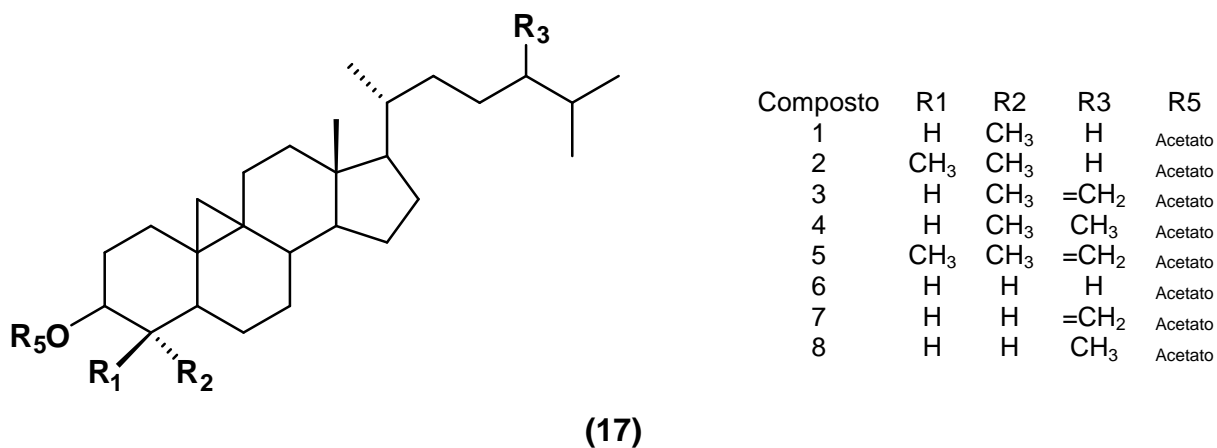


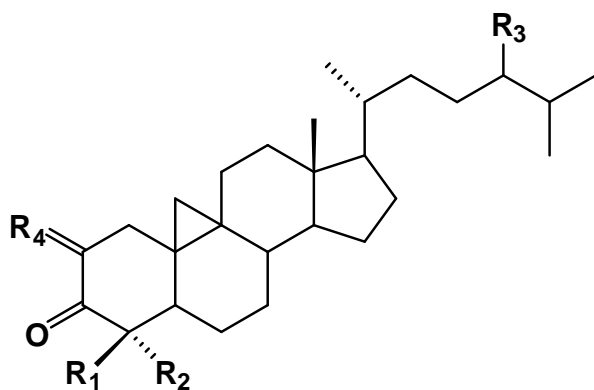
(13)

Os ácidos succínico (**14**) e tetracosanoico (**15**) foram encontrados na espécie *Costus tonkinensis* Gagnep. (QIAO et al., 2002). Da espécie *Cheilocostus speciosus* (J. Koenig) C. Spechit isolou-se o ácido octacosanoico (**16**) (QIAO et al., 2002).



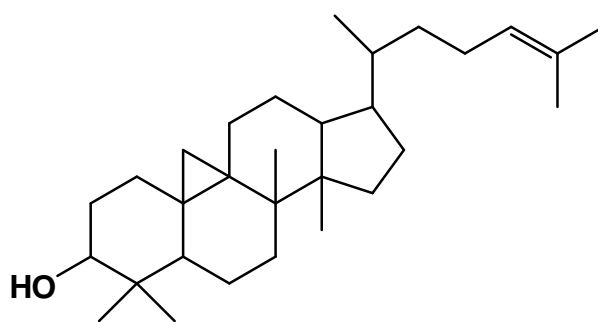
Terpenos e esteróis também são metabólitos comuns nas espécies de *Costus*. Vários alcoóis e cetonas triterpênicos e esteroidais (**17**, **18**) foram identificados no extrato hexânico das raízes e partes aéreas de *C. tonkinensis* Gagnep (BÖHME et al., 1997). A espécie *Cheilocostus speciosus* (J. Koenig) C. Spechit contém os triterpenos cicloartenol (**19**) e 25-en-cicloartenol (**20**) em suas raízes (QIAO et al., 2002). Da mesma espécie foram isolados os dois sesquiterpenos costunolídeo (**21**) (ELISA et al., 2009a) e eremantina (**22**) (ELISA et al., 2009b). Vários sesquiterpenos foram identificados no óleo essencial de *Costus afer* Ker-Gawl, entre eles acetato de sesquilavandulil (**23**) constituindo 17% do óleo, β -cariofileno (**24**) (12,3%) e Z,-E-farnesol (**25**) (9,9%) (TAIWO & BOLANLE, 2003).



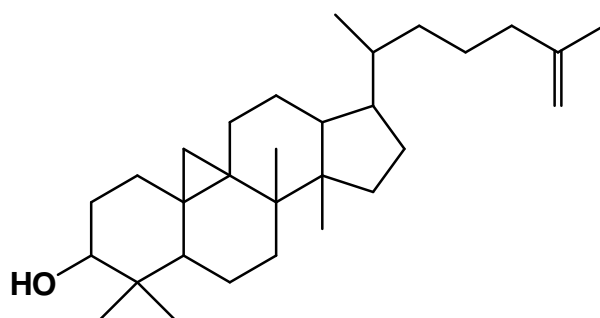


Composto	R1	R2	R3	R4
1	H	CH ₃	H	H ₂
2	CH ₃	CH ₃	H	H ₂
3	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H ₂
4	CH ₃	CH ₃	=CH ₂	H ₂
5	H	H	CH ₃	H ₂

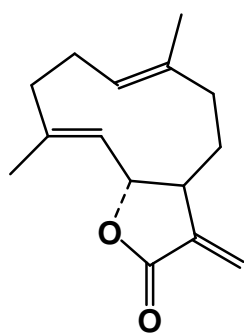
(18)



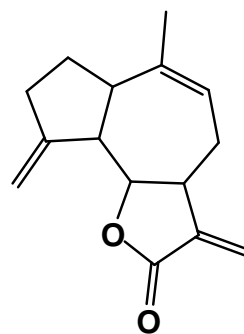
(19)



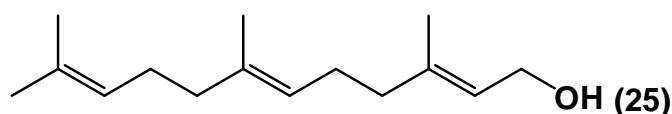
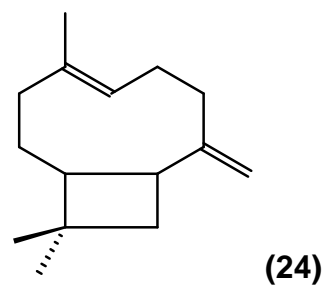
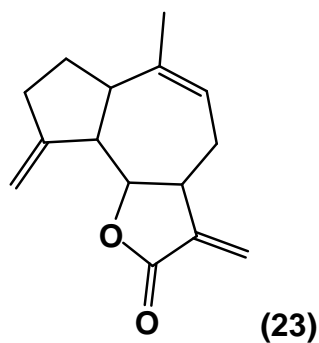
(20)



(21)



(22)



Nos talos frescos de *Costus spicatus* Swartz. foram identificados três polissacarídeos bioativos, constituídos basicamente de glicose (SILVA & PARENTE, 2003).

3.1.1 Atividades biológicas das espécies do gênero *Costus*

Alguns estudos biológicos foram conduzidos a fim de investigar o uso tradicional das espécies do gênero *Costus* e/ou dos constituintes isolados.

A espécie *Costus spicatus* Swartz, cujas folhas e partes aéreas são utilizadas tradicionalmente no Brasil para o tratamento de processos inflamatórios e como analgésico, teve alguns de seus constituintes químicos avaliados em modelos *in vitro* e *in vivo*. Assim, os diglicosídeos de flavonóis **1**, **2** e **3** isolados das folhas da espécie foram incubados com uma suspensão de células retiradas da cavidade peritoneal de camundongos machos BALB/c e inibiram a produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativados (SILVA et al., 2000). As saponinas **11** e **12** isoladas das raízes da mesma espécie foram investigadas quanto aos seus efeitos sobre as atividades de Na⁺ATPase e Na⁺K⁺ATPase do túbulo proximal de rins de cobaias. As saponinas inibiram exclusivamente a atividade da Na⁺ATPase (SOUZA et al., 2004).

Os polissacarídeos isolados dos talos frescos de *Costus spicatus* induziram, em um estudo *in vitro*, significativo aumento da atividade fagocítica. Os polissacarídeos também inibiram o aumento da permeabilidade vascular causada pelo ácido acético (SILVA & PARENTE, 2003). A potencial atividade analgésica do extrato metanólico de folhas de *C. spicatus* foi avaliada em modelos de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e calor, enquanto a atividade anti-inflamatória foi investigada no modelo do edema de pata induzido por carragenina. O extrato metanólico seco foi administrado *per os* nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg. Os resultados demonstraram as atividades antinociceptica e anti-inflamatória do extrato nas doses de 200 e 400 mg/Kg (QUITANS JUNIOR et al., 2010).

C. spicatus é conhecida popularmente na República Dominicana como insulina, sendo utilizada no tratamento de diabetes. Keller et al. (2009) avaliaram a atividade do chá das folhas sobre a glicemia de camundongos C57BLKS/l em um modelo de obesidade com hiperglicemia e progressiva depleção de células beta. O chá não apresentou eficácia no modelo proposto.

Outra espécie conhecida como insulina é *Costus igneus* N.E.Brown, reclassificada como *Chamaecostus cuspidatus* (Nees & Mart) C.Specht & D.W.Stev. (SPECHT et al, 2006). Essa espécie é utilizada pela população indiana e foi avaliada quanto à sua atividade hipoglicêmica em um estudo que utilizou suspensão do pó das folhas em água destilada nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg/dia. Foram utilizados ratos Wistar machos que receberam dexametasona por via subcutânea na dose de 10 mg/Kg.dia durante 20 dias, para a indução da hiperglicemia. As doses de 250 e 500 mg/Kg.dia reduziram a glicemia quase à normalidade (SHETTY et al., 2010).

Conhecida na Índia com o nome de gengibre espiralado, a espécie *Costus pictus* D. Don é utilizada como antihiperglicêmica. Extrato aquoso das folhas foi avaliado em um modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos. A administração *per os* na dose de 250 mg/Kg foi realizada durante 14 dias. A secreção de insulina foi investigada usando ilhotas pancreáticas dos animais. A atividade metabólica de captação de glicose no fígado foi realizada usando D-[¹⁴C]-glicose. O extrato reduziu significativamente a glicemia e aumentou as concentrações de insulina no plasma (GIREESH et al., 2009). Outro estudo

realizado com o intuito de avaliar a atividade antidiabética de *Costus pictus* foi conduzido por Shilpa et al. (2009). Nesse estudo, o extrato metanólico das folhas e a substância tetracosanoato de metila (**13**) isolada do mesmo foram avaliados. O extrato apresentou atividade antidiabética e antiadipogênica. O tetracosanoato de metila demonstrou apenas atividade anti-diabética, o que indica que essa substância não tem ação antiadipogênica ou apresenta ação co-participativa com outro(s) componente(s) da espécie (SHILPA et al., 2009). Em outro estudo, foi avaliada a atividade diurética do extrato aquoso de *C. pictus* administrado *per os* em ratos nas doses de 100 e 200 mg/Kg em comparação com o fármaco furosemida na dose de 4 mg/Kg. A dose de 200 mg/Kg induziu resposta natriurética similar à da furosemida (CAMARGO et al., 2006).

Costus afer Ker também é muito utilizada pela população da Nigéria no tratamento do diabetes. O extrato metanólico das folhas desta espécie foi investigado em estudos *in vitro* e *in vivo*. O teste de letalidade utilizando *Artemia salina* demonstrou que o extrato apresenta significativa toxicidade com um CL₅₀ de 21,3 ppm. O extrato apresentou atividade anestésica. Na dose de 200 mg/Kg o extrato reduziu em 50% a glicemia de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, elevando a glicemia (ANAGA et al., 2004). No estudo conduzido por Udem & Ezeasor (2010), os extratos aquosos das folhas de *C. afer* não apresentaram toxicidade aguda ou induziram morte em camundongos machos e fêmeas até a dose de 4000 mg/Kg. O óleo essencial de *C. afer* foi testado *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* e não mostrou atividade antimicrobiana (TAIWO & BOLANLE, 2003).

3.1.2 A espécie *Costus spiralis*

A espécie *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, conhecida no Brasil como cana do brejo ou cana de macaco, é utilizada tradicionalmente como diurética, depurativa, no tratamento de nefrites, inflamações da uretra e cálculos renais (CORREA, 1926). Ocorre na América do sul, em florestas tropicais, chuvosas ou em afloramentos graníticos (MAAS, 1972).

C. spiralis pode alcançar de 50 cm a 2 m de altura. Apresenta inflorescências racemosas em forma de espiga, possui brácteas vermelhas, fechadas e sobrepostas, dentro das quais se desenvolvem os botões florais e frutos. As inflorescências apresentam cerca de 8 cm de comprimento com uma média de 40 flores, cada uma em uma bráctea. Suas flores são vermelhas, com tubo floral formado por três pétalas fundidas na base e não apresentam odor (ARAUJO & OLIVEIRA, 2007). O rizoma da *C. spiralis* é ramificado e carnoso e suas raízes são quase brancas. Suas hastes são quase eretas, quebradiças, carnosas, fibrosas e conservam a bainha das folhas antigas. O pecíolo é grosso e as folhas são espiraladas, invaginantes, obovadas ou elípticas com até 35 cm de comprimento. Essas folhas são lisas, luzidias, verde escuras na página superior e mais claras na página inferior, onde a nervura média é saliente (CORREA, 1926). Não existem muitos estudos sobre a biologia reprodutiva da família Costaceae e os poucos trabalhos conhecidos foram realizados fora do Brasil (ARAUJO & OLIVEIRA, 2007). A **Figura 2** apresenta imagens da morfologia floral realizada por Araujo & Oliveira (2007).

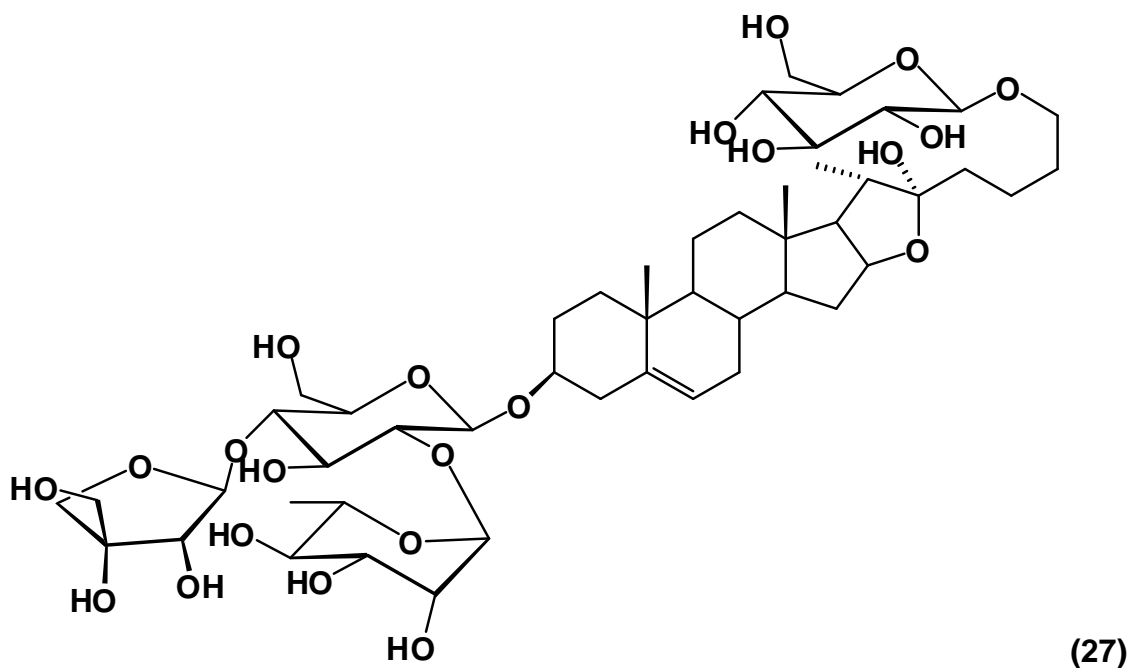
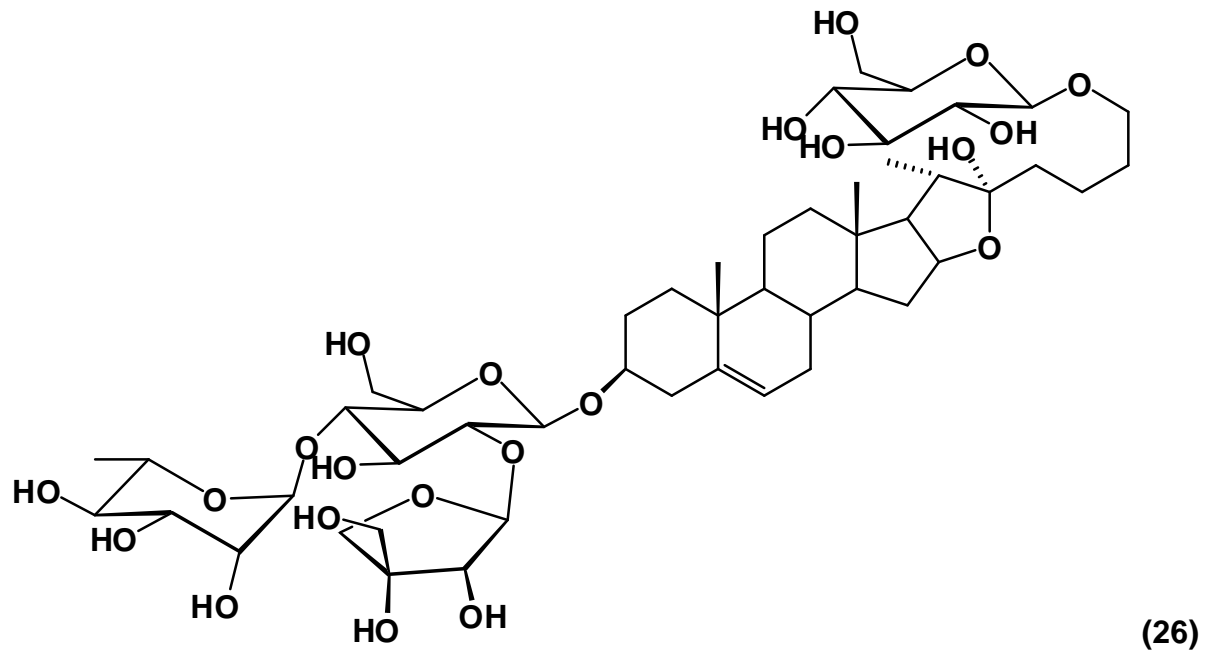
Existem poucos trabalhos na literatura científica sobre atividade biológica e composição química de *C. spiralis*. Um dos primeiros estudos foi realizado por Viel et al. (1999) a partir do extrato aquoso da planta inteira. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiurolitíaca em modelo de implante de cristais de oxalato de cálcio e discos de zinco na bexiga de ratos. Tal implante induz a formação de cálculos renais e hipertrofia da musculatura lisa. Após a inclusão dos cristais e discos na bexiga, os animais foram tratados *per os* com o extrato aquoso das folhas, nas doses de 0,25 e 0,50 g/Kg durante quatro semanas. Após este tempo os animais foram eutanaziados para avaliação do tamanho dos cálculos e da musculatura do órgão. Embora não tenha apresentado atividade diurética ou reduzido a hipertrofia da musculatura lisa da bexiga, o tratamento com o extrato reduziu o tamanho dos cálculos renais. Neste estudo, não foram observados sinais de toxicidade ou mudanças na atividade motora dos animais. Os resultados indicaram atividade antiurolitíaca (VIEL et al., 1999) e Gurocak et al. (2006) sugerem a realização de estudos posteriores para avaliar a possível utilização da planta ou de seus princípios ativos no tratamento de cálculos renais.



Figura 2 Morfologia floral e reprodução de *Costus spiralis*. 1. Inflorescência com uma flor exposta. 2. Tubo floral. 3. Tubo floral em corte longitudinal, mostrando estigma localizado pouco acima da antera. 4. Vista lateral do estigma e da antera. 5. Apêndice dorsal do estigma. 6. *Phaethornis pretrei* visitando flor de *C. spiralis* (Foto: L.C.Rocha). 8. Grãos de pólen germinado no teste de polinização cruzada após duas horas. 9. Fruto de *C. spiralis*. 10. Grãos de pólen viáveis no teste de coloração carmalum acético. 11. Semente de *C. spiralis* germinando (Foto: C.Mendes-Rodrigues). Fonte: ARAUJO & OLIVEIRA, 2007.

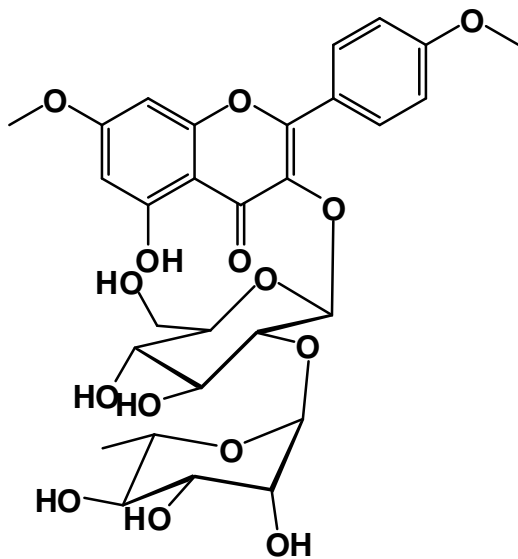
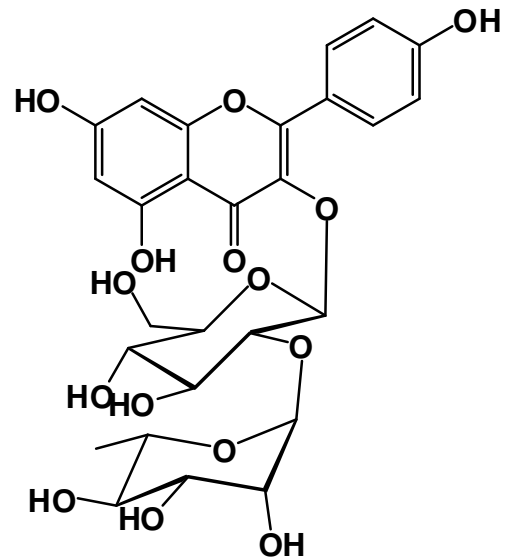
Alguns metabólitos secundários já foram isolados e identificados de *C. spiralis*. Do extrato metanólico 80% dos rizomas, foram isoladas duas saponinas esteroidais: (3 β ,25*R*)-26-(β -D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxifurost-5-en-3-il-O-D-apio- β -D-furanosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosideo (**26**) e (3 β ,25*R*)-26-(β -D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxifurost-5-en-3-il-O-D-apio- β -D-furanosil-(1 \rightarrow 4)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosideo (**27**). A atividade anti-inflamatória dessas saponinas foi avaliada em modelo experimental de aumento da permeabilidade

vascular induzido pelo ácido acético em camundongos. Neste estudo, foi observado que o aumento da permeabilidade vascular induzido pelo ácido acético foi inibido pelas saponinas nas doses de 100 µg/g de peso (SILVA & PARENTE, 2004).



Do extrato metanólico das folhas de *C. spiralis*, Antunes et al. (2000) identificaram e isolaram um novo diglicosídeo de flavonol (3,5-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3-O-

neohesperidosídeo **(28)** e quatro outros diglicosídeos de flavonóis conhecidos canferol-3-O-neohesperidosídeo **(29)**, canferídeo 3-O-neohesperidosídeo **(2)**, quercetina 3-O-neohesperidosídeo **(3)** e tamarixetina 3-O-neohesperidosídeo **(1)**.

**(28)****(29)**

3.2. Inflamação

Inflamação é uma reação natural dos tecidos causada pela ação de um agente agressor.

A inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda se inicia rapidamente e apresenta duração relativamente pequena, de alguns minutos a alguns dias. A resposta inflamatória ocorre em três fases distintas: (1) vasodilatação local, aumento da permeabilidade capilar e conseqüente aumento no fluxo sanguíneo; (2) extravasamento e liberação de proteínas plasmáticas e leucócitos da circulação; e (3) migração e acúmulo de leucócitos no local da lesão. A presença do agente agressor leva à liberação de citocinas, mediadores lipídicos e outros mediadores da inflamação. Alguns mediadores agem nas células endoteliais vizinhas recrutando leucócitos para o local em que se encontra o agente nocivo. Uma vez próximos do agente agressor, os leucócitos são ativados e, por meio da fagocitose, tentarão remover o agente agressor. A inflamação termina quando o agente agressor é

eliminado e os mediadores liberados durante o processo inflamatório são destruídos ou dispersos. Se o agente nocivo não for eliminado rapidamente, o resultado poderá ser uma inflamação crônica (KUMAR et al., 2005).

A inflamação crônica ocorre no transcurso de vários meses ou anos e tem por característica um aumento acentuado na produção de mediadores inflamatórios (CRAIG & STITZEL, 2005). A inflamação crônica não é, necessariamente, uma continuação da inflamação aguda, mas pode ter início com uma reação pouco intensa e, às vezes, assintomática (KUMAR et al., 2005). A fase crônica da inflamação é a causa de dano tecidual e lesão oxidativa dos vasos sanguíneos e tecidos, desempenhando papel importante em doenças debilitantes como artrite reumatoide, aterosclerose, doenças pulmonares crônicas (KUMAR et al., 2005) e câncer (CRAIG & STITZEL, 2005).

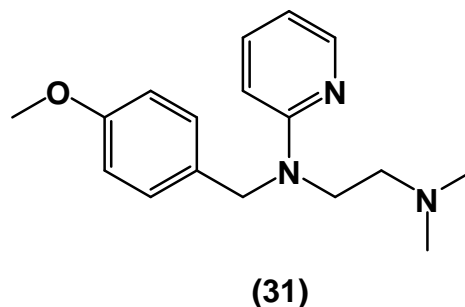
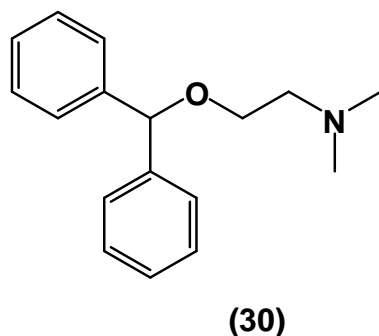
3.2.1. Mediadores químicos do processo inflamatório

Mediadores do processo inflamatório são fatores químicos derivados de células ou de precursores plasmáticos, produzidos ou ativados durante o processo inflamatório. Estes mediadores são responsáveis pela indução de vários sinais e sintomas da resposta inflamatória (KUMAR et al., 2005). Já foram identificados vários mediadores do processo inflamatório e, a seguir, serão abordados os principais.

3.2.1.1. Aminas vasoativas

A histamina é uma amina vasoativa armazenada nas células e é um dos primeiros mediadores liberados no processo inflamatório. Outra amina é a serotonina que apresenta ações semelhantes às da histamina. A histamina está distribuída em todos os tecidos, sendo os mastócitos sua principal fonte. É liberada pela desgranulação das células que a contêm. Dilatação das arteríolas, constrição das artérias de maior calibre e aumento da permeabilidade vascular são consequências

da ação da histamina, principalmente após sua ligação aos receptores H₁ das células endoteliais (KUMAR et al., 2005). Apesar da existência de diversos antagonistas H₁, esses fármacos só têm utilidade no tratamento de eventos vasculares do início do processo inflamatório. Difenidramina (30) e pirilamina (31) são dois antagonistas H₁ representativos (GILMAN et al., 1990).



3.2.1.2. Metabólitos do ácido araquidônico

Os metabólitos do ácido araquidônico (ácido 5, 8, 11, 14 eicosatetraenoico) constituem um importante grupo de mediadores da inflamação e são denominados eicosanoides. O ácido araquidônico é encontrado esterificado nos fosfolípidos das membranas celulares. Por meio da ação das fosfolipases, principalmente a fosfolipase A₂, o ácido araquidônico é clivado e sofre a ação de duas principais classes de enzimas: as ciclooxigenases e as lipoxigenases (KUMAR et al., 2005; CRAIG et al., 2005).

São conhecidas pelo menos duas isoformas da enzima ciclooxigenase. De uma forma geral, a COX1 é constitutiva e é responsável pela produção basal dos eicosanóides, enquanto a COX2 é induzida por citocinas e outros estímulos inflamatórios. Acredita-se que a COX 2 tenha papel mais relevante no processo de inflamação crônica. Os produtos finais da via COX são as prostaglandinas e tromboxanos (CRAIG et al., 2005).

Na via da lipoxigenase existem três isoformas diferentes, sendo a 5-lipoxigenase predominante nos neutrófilos. O principal produto da 5-lipoxigenase é o ácido

hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE) que é convertido nos diversos compostos mediadores da inflamação denominados leucotrienos e lipoxinas (KUMAR et al., 2005).

A via de biossíntese dos eicosanóides mais importantes e os principais alvos moleculares dos fármacos anti-inflamatórios encontram-se representados na **Figura 3**.

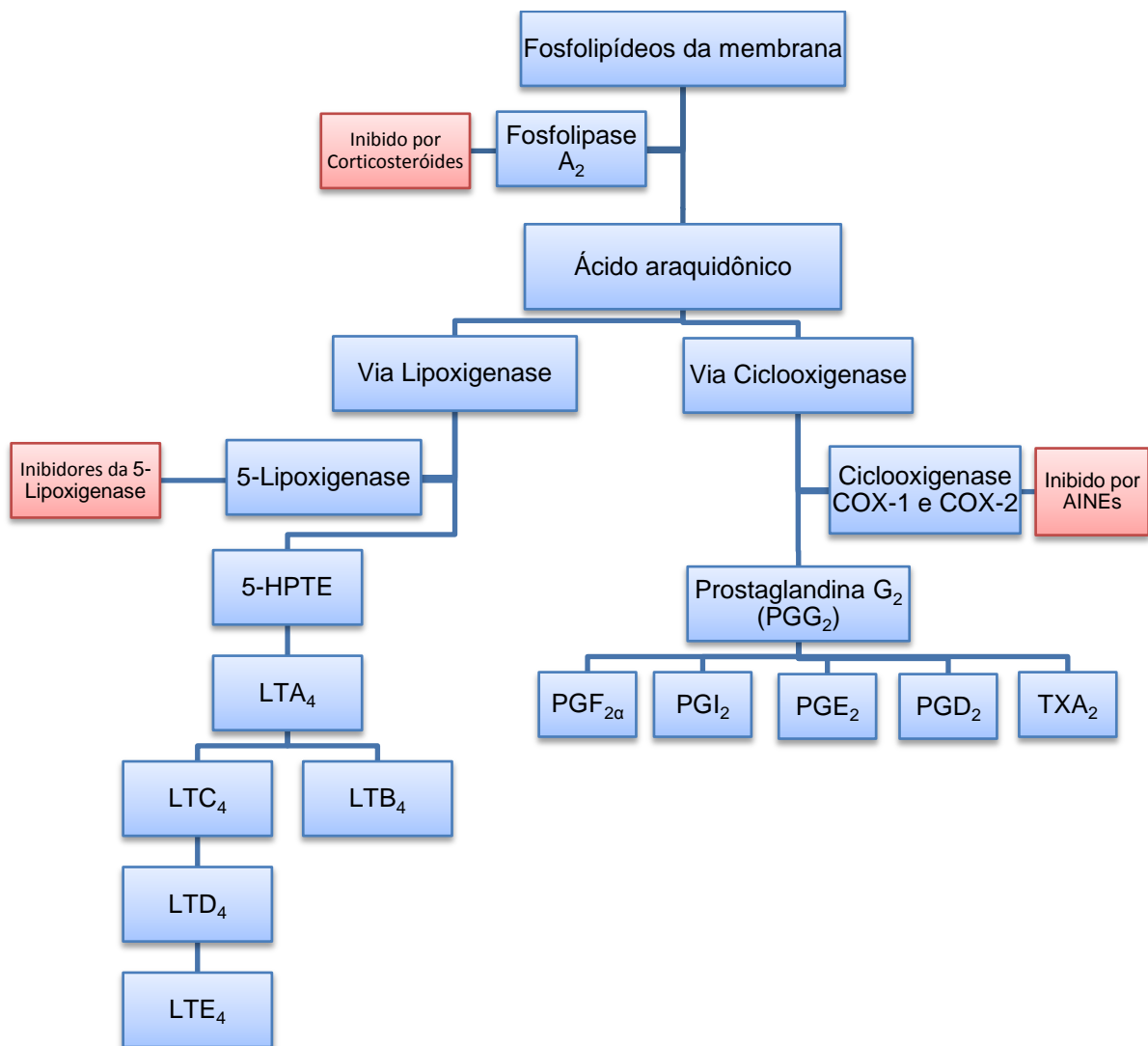


Figura 3 Via de biossíntese dos metabólitos do ácido araquidônico e alvos moleculares de ação de alguns fármacos anti-inflamatórios. HTPE (ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenoico), LTA₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ e LTB₄ (leucotrienos A₄, C₄, D₄, E₄ e B₄ respectivamente), COX (ciclooxygenase), AINEs (anti-inflamatórios não esteroides), PGG₂ (prostaglandina G₂), PGF_{2α}, PGI₂, PGE₂ e PGD₂ (prostaglandinas F_{2α}, I₂, E₂ e D₂ respectivamente), TXA₂ (tromboxano A₂). (KUMAR et al., 2005).

3.2.1.3. Citocinas

Citocinas são mediadores inflamatórios de natureza proteica produzidas por vários tipos celulares, principalmente linfócitos e macrófagos ativados. O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 1 (IL-1) são as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório. Endotoxinas, complexos imunes, lesão física e outros agentes inflamatórios estimulam a secreção destas duas citocinas. As principais ações do TNF α e da IL-1 no processo inflamatório são seus efeitos no endotélio, nos leucócitos e fibroblastos e indução de reações sistêmicas da fase aguda da inflamação. Essas ações estão resumidas na **Figura 4** (KUMAR et al., 2005).

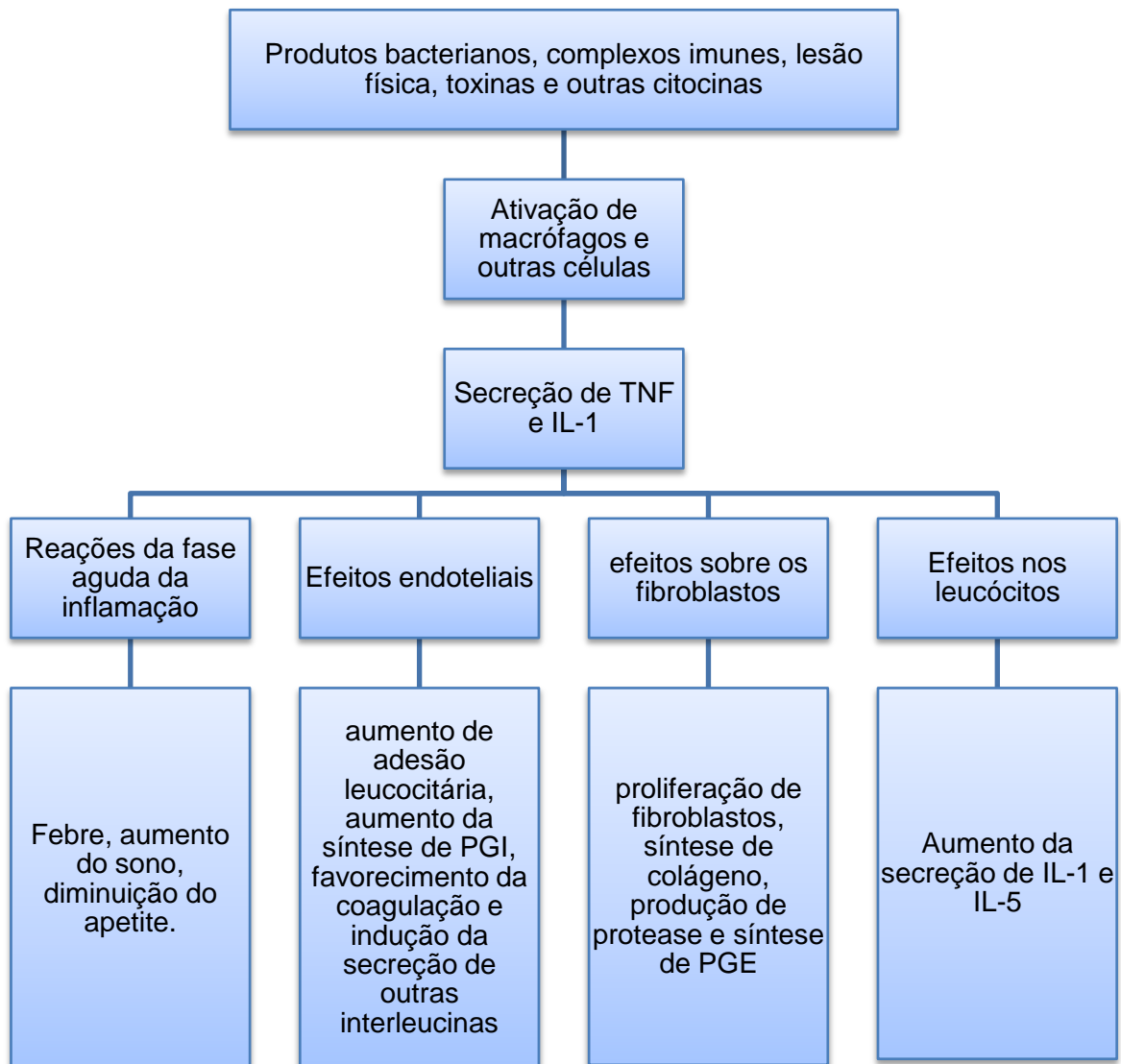


Figura 4 Principais efeitos induzidos pela interleucina 1 (IL-1) e pelo fator de necrose tumoral (TNF α) na inflamação (KUMAR et al., 2005).

3.2.1.4. Oxidantes biológicos

Os oxidantes biológicos, apesar de sua ação bactericida, constituem um importante fator na gênese da lesão tecidual decorrente da resposta inflamatória. Esses oxidantes incluem o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO), o peroxinitrito ($OONO^-$), o ácido hipocloroso (HClO), o radical hidroxila (HO^\bullet) e o oxigênio singlete (1O_2) (CRAIG & STITZEL, 2005).

Entre os agentes oxidantes biológicos destaca-se o NO. Trata-se de um gás solúvel produzido pelas células endoteliais, macrófagos e neurônios do cérebro. Devido ao fato de sua meia vida, *in vivo*, ser de apenas alguns segundos, ele atua apenas na proximidade do local onde é produzido. O NO é produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). As enzimas óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) e a neuronal (NOSn) são expressas constitutivamente e são rapidamente ativadas pelo aumento da concentração de cálcio intracelular. A enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSi) é induzida quando os macrófagos e outras células são ativados por citocinas ou outros agentes inflamatórios (KUMAR et al., 2005). De acordo com Craig & Stitzel (2005), o NO e os demais agentes oxidantes biológicos induzem lesão tecidual além daquela produzida pelos eicosanóides e enzimas digestivas. Desta forma, a inibição da produção desses agentes ou sua inativação por antioxidantes constitui uma alternativa para controle e tratamento de distúrbios inflamatórios.

Para se defender do excesso de radicais livres produzidos a célula possui mecanismos endógenos que podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Entre os mecanismos enzimáticos destacam-se os sistemas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase. O sistema superóxido dismutase catalisa a transformação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 . Catalase e glutatona peroxidase catalisam o processo de transformação de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Em outras palavras, esses sistemas atuam sobre o agente antes que ele cause a lesão. Os mecanismos não enzimáticos incluem a ação da vitamina E, vitamina C e glutatona. A vitamina E é um importante antioxidante lipofílico e age como quelante dos radicais oxidantes produzidos. Por sua vez, a vitamina C é um antioxidante

hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as substâncias reativas de oxigênio. No entanto, em doses elevadas ela pode atuar como pró-oxidante. Já a glutatona é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa das células, pois está presente na maioria delas. A capacidade redutora da glutatona é devida ao agrupamento SH da cisteína (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SHINDO, WITT & HAN, 1994).

3.2.1.5. O modelo experimental do edema de pata

Modelos experimentais auxiliam na avaliação de novas drogas e na investigação do mecanismo de ação das mesmas. Em geral, nesses modelos a reação inflamatória é induzida em órgãos de fácil avaliação qualitativa e quantitativa dos fenômenos envolvidos na inflamação.

O modelo experimental de edema de pata baseia-se na avaliação do volume da pata do animal na qual foi induzido processo inflamatório. O processo pode ser avaliado em diferentes etapas. Além disso, podem ser feitas avaliações histológicas para identificação de alterações morfológicas (BRASILEIRO FILHO, 1998).

A carragenina é o agente mais utilizado na indução do processo inflamatório em camundongos ou ratos. A injeção subplantar de carragenina na pata leva ao acúmulo de líquido resultante do processo inflamatório com consequente formação de edema. A formação desse edema é bifásica. A primeira fase começa imediatamente após a injeção do agente agressor e regride em 1 hora. Nesta fase acumula-se cerca de 40% do volume total e os mediadores envolvidos são principalmente, histamina e serotonina. A segunda fase inicia-se logo após o término da primeira e dura cerca de 3 horas. Essa segunda fase não depende da resposta inflamatória iniciada na primeira fase. De acordo com o estudo de Vinegar et al. (1969), a segunda fase do processo depende da integridade estrutural da molécula irritante, no caso do experimento, a carragenina.

Estudos recentes indicam que a expressão máxima de COX 2 ocorre uma hora após a injeção de carragenina. De acordo com Posadas et al. (2004), as concentrações de nitrato e nitrito na pata dos camundongos atingem os máximos duas horas após a injeção de carragenina e diminuem lentamente após este período. Em contraste, as concentrações de PGE2 são crescentes e atingem a concentração máxima em 72 horas após a injeção intraplantar. Ainda de acordo com Posadas et al. (2004), as expressões de iNOS e eNOS são dependentes da idade e da massa dos animais utilizados e o ideal, em caso de modelos utilizando ratos, é que sejam utilizados animais entre sete e oito semanas, com massa média de 30 g.

Assim, a avaliação da variação do volume da pata de grupos de animais tratados e não tratados fornece informações sobre a capacidade da droga em estudo de inibir processos inflamatórios. Além disso, essa avaliação em função do tempo permite inferir sobre a fase da resposta inflamatória na qual a droga atua e os possíveis medidores que sofrem a sua ação.

3.3. Atividade anti-inflamatória de substâncias de origem natural

Produtos naturais apresentam grande diversidade estrutural. Vários grupos de metabólitos secundários produzidos nas diferentes vias biossintéticas das plantas medicinais apresentam promissora atividade anti-inflamatória. Como exemplo pode-se citar o flavonoide luteolina (**32**). Extraído das folhas de *Perilla frutescens*, utilizada no Japão como anti-inflamatória e antialérgica, a luteolina inibiu a produção do fator de necrose tumoral e edema de orelha de ratos induzido por ácido araquidônico, sendo identificada como o constituinte responsável pela ação farmacológica de *P. frutescens*, (UEDA, YAMAZAKI & YAMAZAKI, 2002). Outros exemplos de flavonoides com ação anti-inflamatória serão descritos no item 3.4. A **Tabela 1** apresenta uma lista de substâncias de origem natural, pertencentes a diferentes grupos de metabólitos, cuja atividade anti-inflamatória foi avaliada em estudos *in vivo* ou *in vitro*, com resultados promissores. A tabela também apresenta a espécie da qual a substância foi isolada.

Tabela 1 – Alguns exemplos de substâncias de origem natural de ação anti-inflamatória

Substância	Grupo metabólico	Espécie vegetal	Alvo de ação	Referência bibliográfica
Triptantrina	Alcaloide	<i>Isatis tinctoria</i>	Inibe a COX 2	DANZ et al., 2002
Sinomenina	Alcaloide	<i>Sinomenium acutum</i>	Inibição da proliferação de linfócitos e liberação de quimiocinas.	WANG et al., 2005
Berberina	Alcaloide	<i>Hydrastis Canadensis</i> <i>Cortex phellodendri</i> <i>Rhizoma coptidis</i>	Diminui os níveis de TNF, IL 1 e 6 e proteína C reativa	CHOI et al., 2006
Ácidos α -Linolenico	Ácido graxo	<i>Ziziphus jujuba</i>	Inibe a enzima COX 2	SU et al., 2002
Guggulsterol	Esteróide	<i>Commiphora mukul</i>	Inibição de TNF, IL e NO	MANJULA et al., 2006
Agnusideo	Terpenol	<i>Vitex peduncularis</i>	Inibe COX 2	SUKSAMRARN et al., 2002
Costunolideo	Terpenol	<i>Magnolia grandiflora</i>	Inibe produção de NO pela regulação da expressão de iNOS	KOO et al., 2001
Woorenosideo	Lignana	<i>Coptis japonica</i>	Suprime a produção de TNF e NO	CHO et al., 2000
Sauchinona	Lignana	<i>Saururus chinensis</i>	Inibe produção de NO	SALEEM et al., 2005
Hipericina	Quinona	<i>Hipericum perforatum</i>	Inibe produção de IL 12	KANG, CHUNG & KIM, 2001
Resveratrol	stilbeno	<i>Veratrum grandiflorum</i>	Inibe COX 1 e 2	BI et al., 2005

3.4. Os flavonoides e sua atividade anti-inflamatória

Os flavonoides compõem uma importante classe de compostos polifenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal. Eles são encontrados em frutas, verduras,

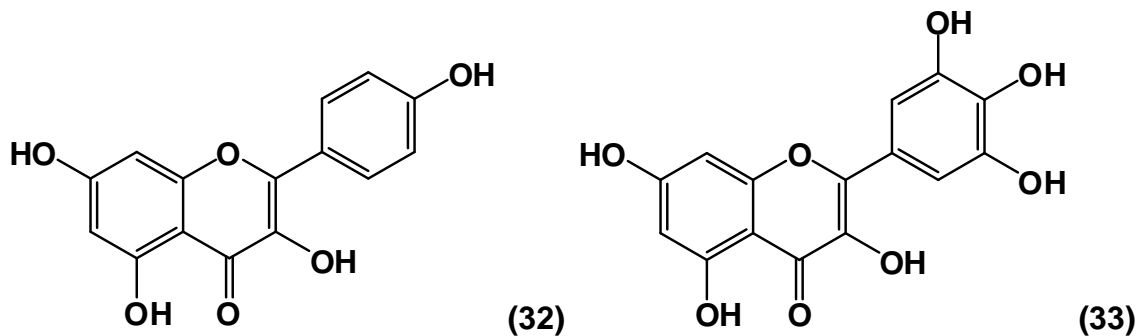
legumes, raízes, cascas e entre outros órgãos vegetais. Muitas plantas conhecidas tradicionalmente pelos seus benefícios à saúde humana apresentaram flavonoides entre seus componentes e, na maioria das vezes, os flavonoides se mostraram responsáveis por parte dos benefícios destes alimentos e plantas. O interesse por esse grupo de metabólitos se tornou maior a partir da descoberta de que a população francesa, apesar de ter uma dieta rica em gordura saturada apresentava taxa de mortalidade devido a problemas cardiovasculares semelhantes a outras populações européias. Esse paradoxo foi atribuído ao consumo regular de vinho tinto nas refeições, sendo o efeito relacionado aos compostos polifenólicos presentes no vinho (FORMICA & REGELSON, 1995).

Os flavonoides induzem alguns efeitos biológicos cujos mecanismos de ação vêm sendo elucidados a partir de uma série de pesquisas. Os efeitos mais conhecidos são: efeitos antiateroscleróticos, antitumorais, antitrombogênicos, antiosteoporóticos, antivirais e anti-inflamatórios.

O efeito dos flavonoides na aterosclerose está relacionado às suas propriedades antioxidantes. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e progressiva, caracterizada por distúrbios do metabolismo lipídico, com presença de células e elementos fibrosos em artérias de calibre grande e médio. O aumento na produção de radicais livres e a diminuição das funções exercidas pelo endotélio são os principais fatores que contribuem para evolução da doença aterosclerótica. Os flavonoides apresentam potencial atividade antioxidante sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e conseqüente inibição de lesões ateroscleróticas (MOURA, 2006). Entre os flavonóides, as flavonas e os flavan-3-ol têm se mostrado os mais poderosos na proteção do organismo contra espécies reativas de oxigênio (NIJVELDT et al., 2001). Segundo Nijveldt et al. (2001), a atividade antitumoral dos flavonoides também está relacionada com sua capacidade antioxidante uma vez que espécies reativas de oxigênio podem danificar o ácido desoxirribonucléico (DNA) e a divisão de células levando a mutações.

Estudos demonstraram a capacidade antitrombótica dos flavonoides *in vivo* e *in vitro*. Os flavonoides quercetina (**6**), canferol (**32**) e miricetina (**33**) foram avaliados quanto a capacidade de inibição plaquetária em cães e macacos e demonstraram

ser inibidores potentes (OSMAN et al., 1998). O mecanismo principal de ação antiagregante dos flavonoides parece estar relacionado com sua capacidade de inibição da produção de tromboxano A₂, que induz a ativação e agregação de plaquetas (LANDOLFI, 1984). A apiina é um dos flavonoides extraídos das folhas de *Petroselinum crispum*. Frações da espécie contendo apiina como componente majoritário apresentaram atividades antiplaquetária e antitrombótica, verificadas por meio de ensaios de agregação plaquetária *in vitro* (CHAVES, 2006).



Os mecanismos de ação anti-inflamatória dos flavonoides já foram investigados. Alguns flavonoides atuam através de apenas um mecanismo, mas a maioria deles apresenta mais de um mecanismo de ação, como descrito a seguir.

Os flavonoides podem atuar sobre as espécies reativas de oxigênio. Conforme descrito no item 3.2.1.4, essas espécies atraem vários mediadores inflamatórios, contribuindo para uma resposta inflamatória geral e dano tecidual. Algumas substâncias endógenas são responsáveis pela eliminação destes radicais livres e os flavonoides podem atuar como aditivo à ação destes compostos endógenos. O mecanismo de ação dos flavonoides sobre espécies reativas de oxigênio está relacionado à sua capacidade de reagir com os radicais livres produzindo radicais flavonoídicos mais estáveis, menos reativos e, portanto, menos danosos às células (NIJVELDT, 2001). A **Figura 5** representa a reação da quercetina com um radical livre produzindo um radical flavonoídico.

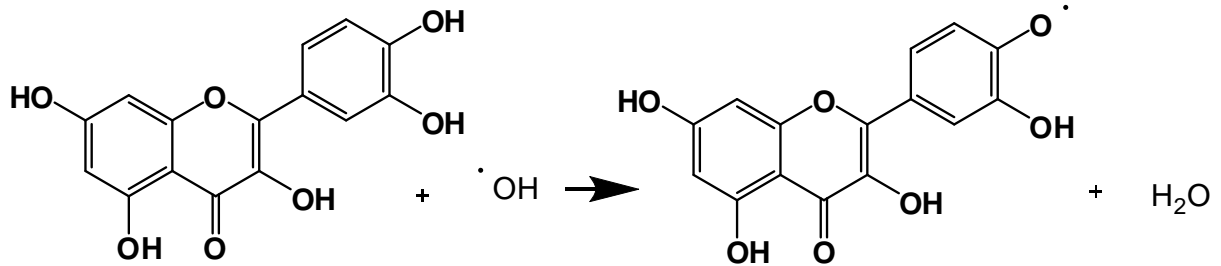
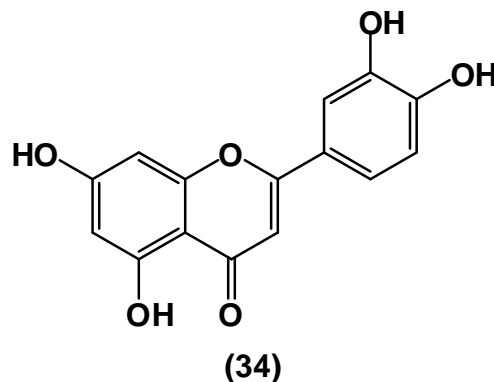


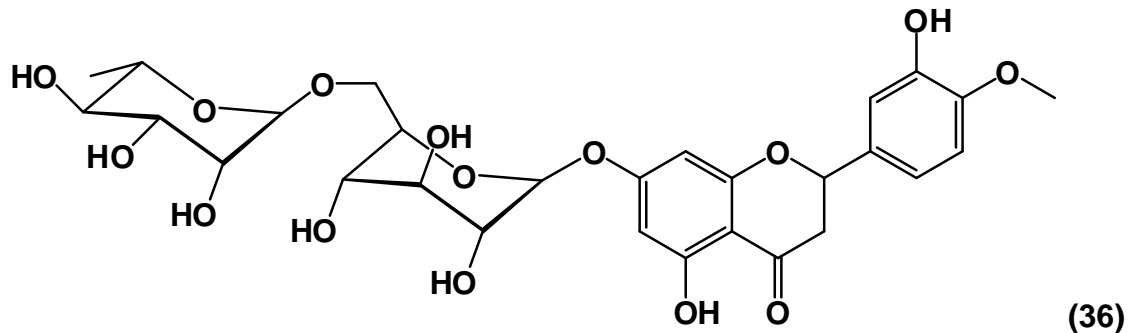
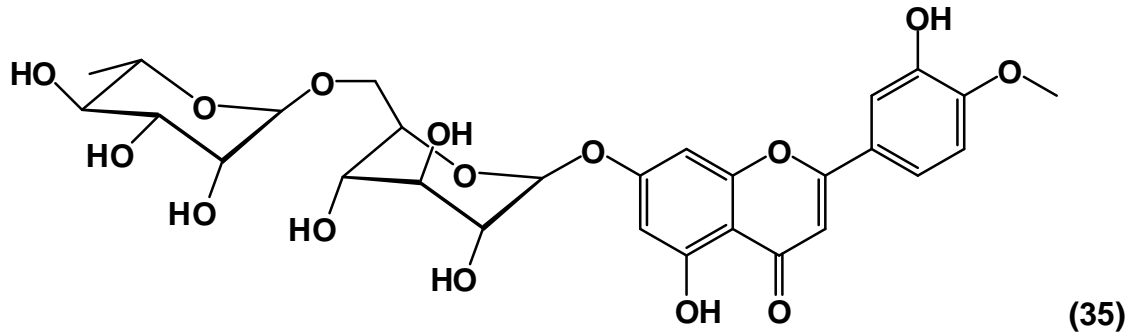
Figura 5 Reação da quercetina com radical livre e produção do radical flavonoídico

Outro mecanismo de ação dos flavonoides bem caracterizado é a sua capacidade de inibir a enzima xantina oxidase. A xantina oxidase é considerada uma via importante na indução de dano oxidativo de tecidos, pois está envolvida na produção de radicais livres de oxigênio, em especial o radical superóxido. Cos et al. (1998) realizaram um extenso trabalho relacionando a estrutura do flavonóide com a atividade inibitória da enzima xantina oxidase e sua capacidade de eliminação de radical superóxido. Eles verificaram que alguns flavonoides atuaram apenas inibindo a enzima, outros agiram apenas na eliminação do radical superóxido produzido, outros apresentaram ambos os mecanismos de ação e alguns não apresentaram nenhum efeito. Os autores observaram a importância de hidroxilas nas posições C5 e C7, bem como a dupla ligação entre C2 e C3 para uma alta atividade inibitória sobre a xantina oxidase. A luteolina **(34)** mostrou ser o inibidor mais potente da xantina oxidase.

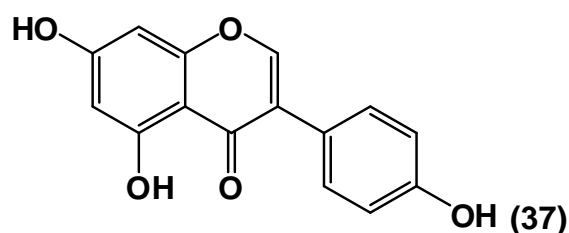


A adesão de leucócitos à parede endotelial constitui uma das etapas iniciais do processo inflamatório e a inibição do número de leucócitos imobilizados durante a reperfusão é um outro mecanismo de ação dos flavonoides. Uma fração purificada de flavonoides contendo 90% de diosmina **(35)** e 10% de hesperidina **(36)** foi

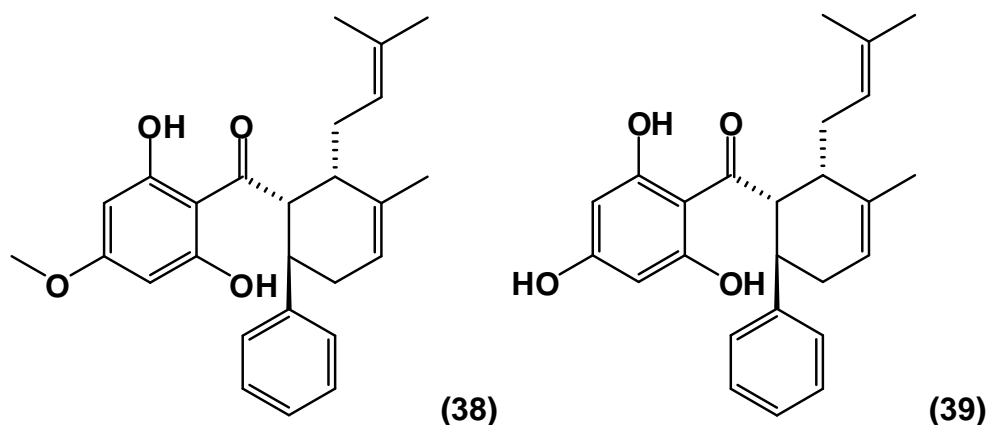
avaliada e demonstrou diminuir a adesão de leucócitos durante a reperfusão (BOUSKELA & DONYO, 1997).



Vários trabalhos comprovam que flavonoides também agem inibindo várias etapas da via metabólica do ácido araquidônico, bem como na modulação do sistema de citocinas. Em um destes trabalhos, luteolina (**34**), quercetina (**6**) e o isoflavonoide genisteína (**37**) inibiram a liberação de TNF- α e IL-6 em macrófagos estimulados *in vitro* (XAGORARI et al., 2001). Luteolina também inibiu a produção de TNF- α , *in vivo*, e reduziu o edema de orelha em camundongos induzido por oxazolona (UEDA et al., 2002).



Panduratina A (**38**) e hidroxipanduratina A (**39**) são chalconas isoladas do extrato clorofórmico das raízes de *Boesenbergia pandurata* (Robx.) Schltr. Estas substâncias apresentaram significativa atividade anti-inflamatória tópica quando testadas no modelo de edema de orelha em camundongos induzido por acetato de 12-O-tetradecanoil forbol (TPA) (TUCHINDA et al, 2002).



Gautan et al. (2009) avaliaram a relação entre a estrutura química e a atividade anti-inflamatória de flavonoides, baseada na análise de diversas publicações anteriores. Segundo os autores, a atividade é influenciada por 10 fatores, relatados a seguir: “(1) Um sistema de anel planar é essencial nas moléculas dos flavonoides para exibir atividade. (2) A presença de ligação dupla entre C2 e C3, e de grupos hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A são necessários. (3) A ausência de grupos hidroxilas no anel B praticamente aboliu a ação anti-inflamatória. (4) Flavonas e flavonóis que contêm grupo hidroxila na posição 4' do anel B apresentam maior atividade que aqueles que não têm grupo hidroxila no anel B. (5) Os flavonóis que têm grupo hidroxila nas posições 3' e 4' (tipo catecol) exibem atividade superior àqueles que apresentam substituinte 3', 4', 5' trihidroxila (tipo pirogalol). (6) A presença de um grupo metoxila na posição 8 do anel A e de grupos hidroxila nas posições 4' ou 3' e 4' (*orto*) no anel B afetam a atividade anti-inflamatória favoravelmente, enquanto grupos hidroxila nas posições 2' e 4' (*meta*) abolem a atividade. (7) A metilação dos grupos hidroxila nas posições 3, 5 ou 4' reforçam a atividade. (8) A metilação do

grupo hidroxila na posição 3 reduz a citotoxicidade. (9) Flavonas exibem mais altas atividades que as isoflavonas correspondentes, flavonóis e flavanonas. (10) A introdução de um glicosídeo reduz a atividade.”

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

- Água ultra pura obtida por meio de sistema de filtração Milli-Q Plus.
- Balança analítica Metler, modelo AB204
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR1000
- Centrivap modelo A50, Labconco
- Espectrofotômetro Quimis Modelo Q 108 DR
- Espectrofotometro Hitachi, modelo 29000
- Evaporador rotatório Büchi, modelo. B480.
- Lâmpada UV para cromatografia Spectroline, modelo 977 C, com λ 254 e 365 nm.
- Lavadora ultrassônica da marca Unique, modelo USC 1400 e lavadora ultrassônica da marca Thornton, modelo T50.
- Liquidificador industrial Cemaf
- Microcentrífuga Cientec, modelo 14000D
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu, em escala preparativa, composto de controlador modelo SCL-8A, detector no UV-VIS modelo SPD-6AV, bomba modelo LC 8A e integrador modelo C-R4A.
- Sistema de CLAE em escala analítica Waters, composto de injetor automático, modelo 2695, detector de arranjos de diodos (DAD) modelo 2996, bomba modelo I – 6200 A e software Empower para processamento dos dados.
- Sistema de CLAE com detector de arranjos de diodos (DAD) acoplado a espectrômetro de massas de ionização eletron spray (CLAE–DAD–MS). Os equipamentos utilizados foram Esquire 3000 Plus e Micro TOF Ic, ambos da Bruker Daltonics, disponíveis na Central Analítica da USP, São Paulo
- Na obtenção dos espectros de RMN foi utilizado um aparelho Bruker Avance de 500 MHz

4.2 Materiais de consumo

4.2.1 Materiais diversos

- Cromatofolhas de gel de sílica F₂₅₄ com indicador de fluorescência (Merck)
- Gel de sílica 60 com tamanho de partículas variando de 0,063-0,200, 70-230 mesh (Merck)
- Gel de sílica 60G (Merck)
- Millex LCR com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos 0,45 µm, 13 mm de diâmetro
- Coluna para CLAE LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 125 x 4 mm d.i., Merck), e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm; Merck)
- Coluna para CLAE Agilent RP-18 (partículas de 10 µm, 21,2 x 250 mm d.i.), pré-coluna SIL 3227 (partículas de 10 µm), Shimadzu.

4.2.2 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados foram das marcas Merck, Fmaia e Aldrich, de grau P.A. Os solventes acetonitrila e metanol de grau cromatográfico utilizados foram da marca Tedia Brasil. Da FMaia foram utilizados acetato de etila (EtOAc), acetona, ácido acético glacial, ácido sulfúrico concentrado, clorofórmio, diclorometano, etanol, hexano (Hex), metanol e butanol. Ácido fórmico e piridina empregados foram da marca Merck e sulfato de sódio anidro da Vetec.

4.2.3 Soluções e reveladores para cromatografia em camada delgada de sílica (CCD)

Reagente de Dragendorff e solução de nitrito de sódio. Dissolveram-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água (solução A). Posteriormente, dissolveram-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água (solução B). Misturaram-se, então, partes iguais das soluções A e B. Para preparo da solução de nitrito de sódio, 5 g de NaNO_2 foram solubilizadas em 100 mL de água. Para revelação das placas primeiramente era borrifado o Reagente de Dragendorff, seguido pela solução de NaNO_2

Reagente Lieberman–Burchard: Adicionaram-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado à 10 mL de anidrido acético.

Solução de acetato de chumbo a 30 % m/v: pesaram-se 30 g de acetato de chumbo e diluiu-se em água suficiente para perfazer 100 mL.

Solução de ácido sulfúrico a 5% e solução de vanilina a 1%: Para preparo da solução ácida adicionaram-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado à balão volumétrico de 100 mL e completou-se com etanol. A solução de vanilina foi preparada solubilizando-se 1g de vanilina em 100 mL de etanol. Para revelação das placas primeiramente era borrifada a solução de ácido sulfúrico seguida pela solução de vanilina.

Solução de anisaldeído sulfúrico: Dissolveram-se 0,5 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial. Em seguida, adicionaram-se 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Solução de baixa concentração eletrolítica: 300 mL de água, 0,6 mL de tensoativo lauril éter sulfato de sódio e 13 mL de salina.

Solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12 % m/v: dissolveram-se 12 g de cloreto de alumínio hexahidratado em balão volumétrico de 100 mL, utilizando metanol para dissolver e completar o volume do balão.

Solução de cloreto férrico a 2 % m/v: dissolveram-se 2 g de FeCl_3 em 100 mL de etanol.

Solução de hidróxido de potássio a 5 % m/v: dissolveram-se 5 g de KOH em 100 mL de etanol.

Solução de hidróxido de potássio a 10 % m/v: dissolveram-se 10 g de KOH em 100 mL de etanol.

Solução de Produtos Naturais + polietilenoglicol 4000 (NP/PEG): Dilui-se 1 g de ácido difenilbórico em 100 mL de metanol para preparo do Reagente de Produtos Naturais (NP). Para preparo da solução de polietilenoglicol 4000 (PEG), 5 g deste foram diluídos em 200 mL de etanol. Para revelação das placas primeiramente era borrifada a solução de NP seguida da de PEG.

4.2.4 Substâncias de referência

As substâncias de referência aloina, boldina, cumarina, 8-metoxipsoraleno, digoxina, canferol, lapachol, quercetina e rutina foram obtidos da Sigma Aldrich. Ácido ursólico, catequina e cumarina foram isolados no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.3 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta da amostra vegetal foi realizada pelo aluno de doutorado André Mesquita Marques, em outubro de 2009, no campus da Universidade Federal do Rio de

Janeiro. Foram coletados caules e folhas. Uma amostra da planta inteira contendo raiz e inflorescência foi utilizada na identificação, realizada pelo professor Dr. João Marcelo Alvarenga Braga, pesquisador associado do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que a identificou como sendo *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe. Uma excicata da mesma foi depositada no herbário do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número RB 509516.

4.4 Preparo do material vegetal e extração

O material vegetal foi seco à sombra e separado em folhas e caule. As folhas foram trituradas em liquidificador industrial, sendo obtidas 720,25 g de pó. Desse material foram reservados 100 g do pó para testes futuros e os 620,25 g restantes foram utilizados na extração.

A extração foi realizada utilizando-se etanol comercial (96 °GL-92,8 °INPM), por percolação, com troca de solvente a cada 24 horas (consumo total de 18 L de etanol).

O extrato etanólico obtido foi seco em rotavapor, sob pressão reduzida, a 40 °C e o resíduo coletado em cápsula de porcelana previamente tarada e pesada. A cápsula foi mantida em dessecador sob vácuo para eliminação total do solvente e pesada sucessivamente até peso constante. Foram obtidos, ao final do processo, 67,44 g (10,87% de rendimento) de extrato seco bruto de *Costus spiralis*, denominado EECS.

4.5 Prospecção fitoquímica

Foi realizada a prospecção fitoquímica de EECS por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel. Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD para a avaliação de flavonoides, taninos, antracênicos, saponinas, cumarinas, alcaloides,

naftoquinonas, triterpenos, esteróis e cardenólídeos. Diferentes sistemas de eluentes e reveladores foram utilizados para cada classe de produto natural, conforme descrito abaixo (WAGNER et al., 1984).

4.5.1 Identificação de flavonoides

Solubilizou-se exatamente 0,5008 g de EECS em 10 mL de metanol, em banho de ultra-som, por 15 minutos. Utilizou-se a solução resultante para a CCD.

- Fase móvel: butanol: ácido acético glacial: água (40:10:50). Utilizou-se a fase superior como eluente.
- Reveladores: UV λ 365 nm e NP/PEG.
- Substâncias de referência: quercetina, rutina e canferol (soluções a 1 mg/mL em metanol).
- Identificação: flavonoides se apresentam como manchas de cor amarela, azul ou verde em UV λ 365 nm. O NP/PEG aumenta a fluorescência no comprimento de onda utilizado.

4.5.2 Identificação de taninos

Utilizou-se a mesma solução preparada para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: clorofórmio: acetona: ácido fórmico (65:27:8).
- Revelador: solução de cloreto férrico a 2% m/v.
- Substância de referência: catequina (1 mg/mL em metanol).
- Identificação : taninos se apresentam como manchas negro azuladas ou negro esverdeadas no visível.

4.5.3 Identificação de antracênicos

Utilizou-se a mesma solução preparada para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: acetato de etila: metanol: água (81:11:8)
- Revelador: KOH 5% m/v e aquecimento a 100 °C por cinco minutos.
- Substância de referência: aloína (1 mg/mL em metanol).
- Identificação: compostos antracênicos se apresentam como manchas de coloração amarela a vermelha no visível e fluorescências laranja a vermelhas no UV λ 365 nm.

4.5.4 Identificação de naftoquinonas

Solubilizou-se 0,2 g do EECS em 2 mL de metanol em banho de ultrassom por 15 minutos. Utilizou-se a solução resultante para CCD.

- Fase móvel: hexano: diclorometano (2:8 v/v).
- Substância de referência: lapachol (1 mg/mL em metanol).
- Revelador: visualização direta no visível
- Identificação: naftoquinonas aparecem como manchas de coloração amarela ou laranja no visível.

4.5.5. Identificação de saponinas

Utilizou-se a mesma solução preparada para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: clorofórmio: metanol: água (64:50:10)
- Padrão de referência: saponina purificada (2 mg/mL em mistura de água:metanol 1:1 v/v).
- Reveladores: ácido sulfúrico a 5% v/v em etanol e vanilina a 1% m/v em etanol.

- Identificação: saponinas se apresentam como manchas de coloração azul ou azul violeta e zonas amarelas no visível.

4.5.6 Identificação de cumarinas

Solubilizou-se exatamente 0,0997 g do extrato etanólico seco em 1 mL de metanol em banho de ultrassom por 30 minutos. Utilizou-se a solução resultante para CCD.

- Fase móvel: acetato de etila.
- Substância de referência : cumarina; 8-metoxipsolareno (1 mg/mL em metanol).
- Reveladores: solução de KOH a 10% m/v em etanol.
- Identificação: cumarinas se apresentam como manchas de fluorescência verde azulada ou amarela esverdeada em UV λ 365 nm

4.5.7 Identificação de alcaloides

Utilizou-se a mesma solução preparada para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: acetato de etila, metanol, água (100:13.5:10 v/v).
- Substância de referência: boldina (1mg/mL em metanol).
- Reveladores: reagente de Dragendorff e NaNO_2 a 5 % m/v (aq).
- Identificação: alcaloides se apresentam como manchas de cor marrom ou laranja no visível.

4.5.8 Identificação de triterpenos e esteróides

Solubilizou-se em banho maria 0,1 g de EECS em 1 mL de clorofórmio.

- Fase móvel: diclorometano: acetato de etila (1:1 v/v).
- Padrão de referencia: ácido ursólico.

- Revelador: reagente de Libermann–Burchard.
- Identificação: manchas pardas a vermelhas ou róseas escuras indicam resultado positivo para triterpenos pentacíclicos livres. Manchas azuis que mudam pra um verde persistente indicam a presença de esteróis livres.

4.5.9 Identificação de cardenólídeos

Extraiu-se 0,2005 g de EECS com 10 mL de etanol e 1 mL de solução aquosa de acetato de chumbo a 20% m/v, em banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida, filtrou-se e adicionou-se 3 mL de clorofórmio à solução resultante. Centrifugou-se a 10000 rpm por 10 minutos para decompor a emulsão. À solução clorofórmica adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o filtrado ate resíduo. O resíduo foi solubilizado em 1 mL de metanol e utilizado para CCD.

- Fase móvel: acetato de etila: metanol: água (81:11:8 v/v).
- Padrão de referência: digoxina.
- Revelador: ácido sulfúrico concentrado.
- Identificação: cardenólídios se apresentam como manchas azuis violetas ou marrons no visível e fluorescência azul, amarela, verde ou marrom em UV λ 365 nm.

4.6 Fracionamento do extrato etanólico de *Costus spiralis* (EECS)

O extrato etanólico das folhas de *C. spiralis* (45,48 g) foi fracionado em coluna cromatográfica utilizando gel de sílica como fase estacionária e eluentes de polaridade crescentes como fase móvel. EECS foi incorporado a 120 g de gel de sílica G 60, em grau de porcelana. Uma coluna de 680 mm de comprimento por 68 mm de diâmetro foi empacotada com 675 g de gel de sílica G 60. A mistura de EECS com a sílica foi colocada no topo da coluna e procedeu-se a eluição sequencial com: hexano, hexano:diclorometano (1:1 v/v), diclorometano, diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1

v/v), metanol e metanol:ácido acético glacial (95:5 v/v). Foram coletadas frações de 200 mL. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel usando solução de anisaldeído sulfúrico como revelador e o próprio solvente utilizado na separação como eluente. Foram obtidas oito frações nomeadas de acordo com os solventes empregados na eluição. A **Tabela 2** apresenta as frações obtidas e o volume de cada eluente empregado no fracionamento. Essas frações foram secas em rotavapor em temperatura inferior a 45 °C.

Tabela 2 – Fracionamento preliminar do EECS por cromatografia em coluna de gel sílica G 60.

Frações	Eluentes	Volume de eluentes (mL)
F Hex	Hex	1600
F Hex:DCM	Hex:DCM (1:1 v/v)	17000
F DCM	DCM	10800
F DCM:EtOAc	DCM:EtOAc (1:1 v/v)	5200
F EtOAc	EtOAc	14000
F EtOAc:MeOH	EtOAc:MeOH (1:1 v/v)	11000
F MeOH	MeOH	6200
F MeOH: AcOH	MeOH:AcOH (95:5 v/v)	1000

NOTA: F Hex: fração hexânica; F Hex:DCM: fração hexano e diclorometano; F DCM: fração diclorometânica; F DCM:EtOAc: fração diclorometano e acetato de etila; F EtOAc: fração em acetato de etila; F EtOAc:MeOH: fração de acetato de etila e metanol; F MeOH: fração metanólica; F MeOH:AcOH: fração metanólica acidulada com ácido acético.

4.7 Perfis cromatográficos por CLAE-FR de EECS e frações derivadas

A fim de obter perfis cromatográficos por CLAE-FR de EECS e frações oriundas do mesmo foram preparadas soluções. Os solventes utilizados no preparo das soluções e as respectivas concentrações estão descritas na **Tabela 3**. A dissolução foi realizada com o auxílio de um banho de ultra-som por 1 minuto. Após esse tempo,

as soluções foram centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante límpido foi transferido para *vials* de vidro de 2 mL.

Tabela 3 – Concentrações e solventes utilizados no preparo das soluções empregadas na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD.

Material analisado	Solvente	Concentração (mg/mL)
EECS	MeOH	11,16
F Hex	ACN	5,83
F Hex:DCM	ACN	5,89
F DCM	ACN	4,86
F DCM:EtOAc	MeOH	5,28
F EtOAc	MeOH	5,35
F EtOAc:MeOH	MeOH	5,11
F MeOH	MeOH	6,58
F MeOH: AcOH	MeOH	5,29

Os perfis foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, utilizando detector de arranjos de diodo (CLAE-FR-DAD). Foi utilizada coluna Lichrospher® 100 18 RP (partículas de 5 µm, 125 x 4mm d.i., Merck), e pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) e fluxo de 1mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 30 ± 5 °C. Foram injetados 10 µL de cada solução e o fluxo foi de 1 mL/minuto. A leitura foi realizada em λ 210 nm sendo registrados numa faixa espectral de λ200 a 600 nm. Empregou-se como fase móvel uma mistura de água: acetonitrila em gradiente linear conforme **Tabela 4**.

Tabela 4 – Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLAE-DAD para EECS e frações derivadas.

Tempo (minutos)	H₂O (%)	ACN (%)
0	95	5
55	5	95
60	95	5

4.8 Identificação dos flavonoides de EECS por CLAE-MS/MS

Com o intuito de caracterizar os flavonoides presentes em EECS foram realizadas análises por CLAE de fase reversa com detector de arranjos de diodo acoplado à espectrometria de massas no modo positivo de ionização. As análises foram realizadas na Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP), capital. Os equipamentos utilizados foram Esquire 3000 Plus e MicroTof Ic, ambos da Bruker Daltonics.

4.9 Refracionamento da fração EtOAc:MeOH

A fração EtOAc:MeOH foi inicialmente purificada por extração sólido-líquido com acetato de etila e metanol. Na realização do processo, cerca de 1 g da fração foi misturada a 10 mL de EtOAc, agitada e deixada em repouso para decantação por alguns minutos. O líquido sobrenadante foi reservado. Repetiu-se o procedimento mais duas vezes utilizando 10 mL de EtOAc cada vez. As soluções em EtOAc foram reunidas e reservadas. Ao resíduo foram adicionados 10 mL de MeOH. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 minutos para decantação. O líquido sobrenadante foi reservado. As soluções em EtOAc e em MeOH foram, separadamente, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Os líquidos sobrenadantes foram colocados para secar em evaporador rotatório a 40 °C. Observou-se, através de CCD (condições descritas para flavonoides no item 4.5.1), que ambos resíduos continham flavonoides. Esta etapa foi realizada quatro vezes, utilizando um total de 4,01 g da fração EtOAc:MeOH e obtendo totais de 752,8 mg de resíduo da solução em EtOAc e 1331,6 mg de resíduo da solução em MeOH.

A partir dos resíduos obtidos foram preparadas soluções metanólicas, na concentração de 100 mg/mL para refracionamento por CLAE-FR preparativa. No refracionamento foi utilizada coluna Agilent RP-18 (partículas de 10 µm 21,2 × 250 mm d.i.) e pré coluna SIL 3227 (partículas de 10 µm), sendo realizada em sistema de CLAE Shimadzu descrito nos Equipamentos (item 4.1). A eluição foi realizada

com gradiente linear de água e MeOH descrito na **Tabela 5**. Os solventes foram previamente deaerados em banho de ultrassom por 24 minutos. Porções de 100 mg solubilizados em 2 mL de metanol e foram injetados em cada separação, sendo recolhidas frações dos picos correspondentes aos flavonoides. As frações foram secas em Centrivap e, após análise em CLAE-FR analítico, foram reunidas de acordo com os perfis e grau de pureza. As frações contendo substâncias puras foram reunidas e as frações contendo misturas foram refracionadas em CLAE-FR preparativo nas mesmas condições. Realizou-se um total de nove separações iniciais e dezoito refracionamentos. A **Figura 6** resume as etapas descritas anteriormente e as massas obtidas de cada substância.

Tabela 5 - Gradiente de eluição empregado no refracionamento da fração EtOAc:MeOH e das misturas de substâncias.

Tempo (min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)
0	95	5
70	0	100
100	0	100

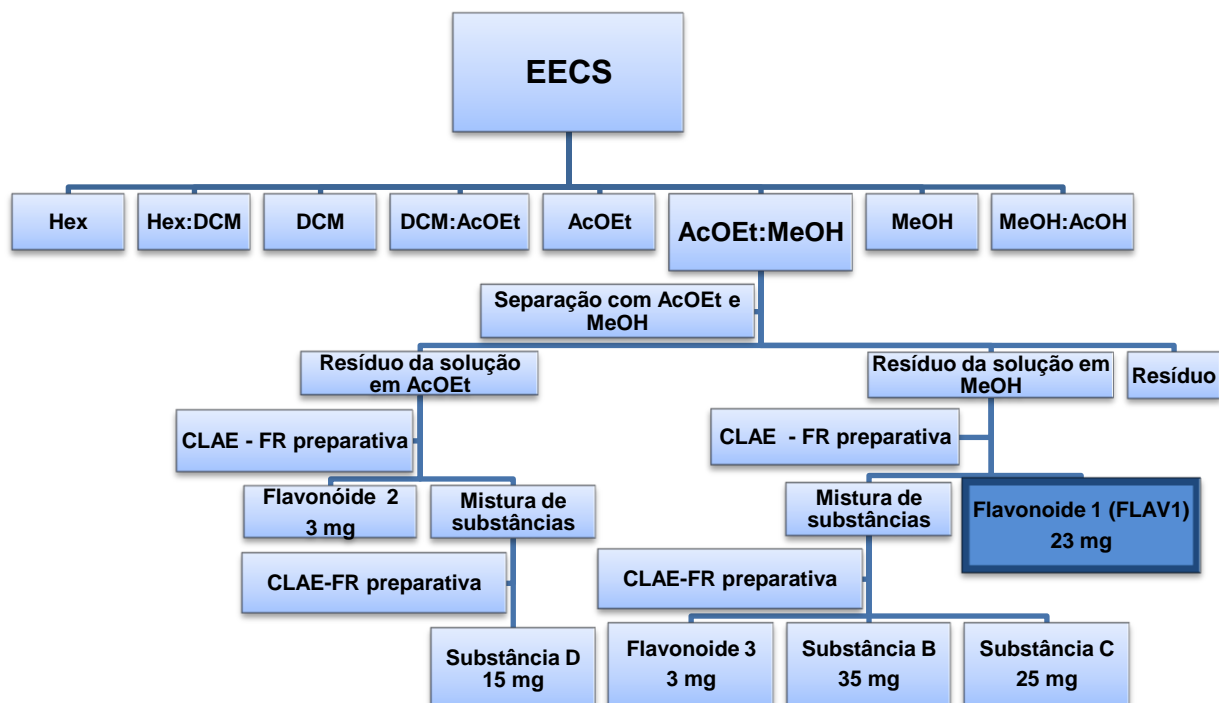


Figura 6 Diagrama resumido de etapas de isolamento das substâncias

4.10 Caracterização das substâncias isoladas a partir da fração EtOAc:MeOH

A elucidação estrutural de FLAV1 foi realizada a partir de dados espectroscópicos no infravermelho (IV), ultravioleta (UV), e por espectros de massa, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , por técnicas mono e bidimensionais (HSQC e COSY).

Para caracterização do esqueleto básico de FLAV1 através de técnicas UV foram utilizados os procedimentos propostos por Mabry et al. (1970). Foi realizada marcha de leituras UV em varredura de λ 220 a 600 nm das seguintes soluções:

- Solução estoque do FLAV1 0,3 mg/mL
- Solução estoque do FLAV1 0,3 mg/mL acrescida de 3 gotas de solução metanólica de metóxido de sódio (MeONa) 2,5% m/v. Leitura realizada imediatamente e 5 minutos após.
- Solução do item anterior acrescida de 3 gotas de solução aquosa de HCl 50%v/v.
- Nova solução estoque de FLAV1 acrescida de 6 gotas de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5% m/v.
- Solução do item anterior acrescida de 3 gotas de solução aquosa de HCl 50%v/v.
- Nova solução estoque de FLAV1 acrescida de acetato de sódio anidro (AcONa) até formação de solução saturada. Leitura realizada 3 minutos após para garantir completa reação.
- Solução do item anterior acrescida de ácido bórico (H_3BO_3) até formação de solução saturada.

Para hidrólise de FLAV1 foi utilizada técnica descrita por Simões (2010). A 2,0 mg de FLAV1 adicionou-se 1 mL de metanol e 2 mL de HCl 2 mol/L. A solução foi deixada em banho Maria a 80 °C por 4 horas. Posteriormente, essa solução foi particionada com DCM em funil de separação. A fase aquosa resultante foi submetida a análise por CCD, comparando-se com soluções de diferentes açúcares

(D-glicose, L-ramnose, D-galactose e L-arabinose). O eluente utilizado foi clorofórmio, metanol e água (70:30:40) e revelada com solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Para facilitar a visualização das manchas obtidas utilizou-se lâmpada UV λ 365 nm.

Os cromatogramas de FLAV 1 foram registrados a partir da análise em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodo CLAE-FR-DAD em UV λ 210 nm. Foi utilizado equipamento Waters[®], composto de injetor automático, modelo 2695, com sistema operacional computadorizado com software Empower e detector de arranjos de diodos (DAD), modelo 2996, bomba modelo I-6200 A, integrador modelo C-R4A.

Os espectros no IV foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum One.

Sistema de CLAE-DAD acoplado a espectrômetro de massas de ionização eletronspray (CLAE-DAD-ESI-MS) foi utilizado para obtenção dos espectros de massa. Tais espectros foram obtidos na Central Analítica da Universidade de São Paulo. Os equipamentos utilizados foram Esquire 3000 Plus e Micro TOF Ic, ambos da Bruker Daltonics.

Os espectros RMN de ¹H, HSQC e COSY foram obtidos no departamento de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.11 Validação do método de quantificação de flavonoides totais no extrato comercial das folhas de *C. spiralis* e quantificação de flavonoides totais em EECS e na fração EtOAc:MeOH

O extrato seco comercial de *C. spiralis* foi produzido pela Indústria Farmacêutica Catedral LTDA para os Laboratórios Osório de Moraes LTDA, o qual utiliza esse extrato como insumo farmacêutico na produção do medicamento Pílulas De-Lussen[®].

A validação do método de quantificação dos flavonoides totais do extrato comercial de *C. spiralis* (EICS) foi realizado conforme resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos para indústrias farmacêuticas e de acordo com os parâmetros e especificações da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1994 e 1996) e *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

4.11.1 Método de quantificação espectrométrica de flavonoides totais

Extração

Pesaram-se exatamente, cerca de 2,5 g de EICS. Transferiu-se quantitativamente para balão de fundo redondo de 250 mL, adicionaram-se 12 mL de metanol e aqueceu-se a mistura em manta elétrica sob refluxo por 30 minutos. O extrato obtido, resfriado em temperatura ambiente, foi filtrado em algodão. O filtrado foi recolhido em balão volumétrico de 25 mL e reservado. Retornou-se o algodão para o balão de fundo redondo utilizado anteriormente, adicionaram-se 10 mL de metanol e procedeu-se a novo refluxo por mais 30 minutos. O novo extrato foi resfriado em temperatura ambiente e filtrado em algodão reunindo o filtrado àquele reservado no balão volumétrico de 25 mL. Lavou-se o algodão com metanol e utilizou-se o metanol de lavagem para completar o volume do balão volumétrico.

Eliminação de carotenóides e clorofila

Transferiram-se 15 mL do extrato para tubo falcon de 50 mL. Adicionaram-se 6 mL de clorofórmio e 9 mL de água. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 5.000 rpm, por 10 minutos, para completa separação das fases. A fase hidrometanólica (superior) foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com metanol.

Reação de complexação

Pipetou-se uma alíquota (5 mL) da solução hidrometanólica para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de uma mistura de piridina:água (2:8 v/v) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12 % m/v. Completou-se o volume com água. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 15 minutos. Transferiu-se a mistura para tubo falcon e centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para cubetas de quartzo e, após 30 minutos da adição do AlCl_3 , mediu-se a absorvância da solução em 420 nm, utilizando o líquido de compensação como branco.

Branco

Misturaram-se 5 mL da solução hidrometanólica (obtida no item extração), 0,6 mL de ácido acético glacial e 10 mL de uma mistura de piridina:água (2:8 v/v). Completou-se o volume com água. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 15 minutos. Transferiu-se a mistura para tubo falcon e centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado como branco.

Solução padrão

Pesaram-se exatamente, cerca de 3 mg de quercetina (substância de referência) e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL utilizando metanol para dissolver e completar o volume. Pipetou-se uma alíquota (15 mL) dessa solução para outro balão de 25 mL e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se, com auxílio de pipeta, alíquota de 5 mL da solução anterior para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de uma mistura de piridina:água (2:8 v/v) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12 % m/v. Completou-se o volume com água. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 15 minutos. Transferiu-se a mistura para tubo falcon e centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. Após 30 minutos da adição do AlCl_3 mediu-se a absorvância da solução em 420 nm, utilizando como branco uma solução preparada com 5 mL de metanol, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de

uma mistura de piridina:água (2:8 v/v) e completando o volume para 25 mL com água.

4.11.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir de espectros UV registrados para soluções com e sem adição do reagente de complexação (solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12 % m/v), no intervalo de 200 a 800 nm. A seletividade do método foi avaliada em 420 nm, comprimento de onda utilizado na leitura. Para que o método seja considerado seletivo, a solução sem adição do reagente de complexação não deve apresentar nenhuma absorção significativa em 420 nm, indicando que a matriz não apresenta interferentes para quantificação do complexo formado.

4.11.3 Linearidade

Pesaram-se exatamente, cerca de 3 mg de quercetina (substância de referência) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL utilizando metanol para dissolver e completar o volume do balão. Pipetou-se uma alíquota (15 mL) dessa solução para outro balão de 25 mL e completou-se o volume com metanol. Essa foi denominada solução estoque do padrão. Alíquotas de 4,0 mL, 4,5 mL, 5,0 mL, 5,5 mL e 6,0 mL da solução estoque do padrão foram pipetadas, separadamente, para balões volumétricos de 25 mL. Em cada balão adicionaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina:água (2:8 v/v) e 2,5 mL de solução metanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 12 % m/v. Completou-se o volume com água e as concentrações das soluções finais constam na **Tabela 10** (pag 110). Homogeneizou-se e as misturas foram deixadas em repouso por 15 minutos. Transferiram-se as misturas para tubos falcon de 50 mL e centrifugaram-se a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubetas de quartzo e após 30 minutos da adição do AlCl_3 foi realizada a leitura em 420 nm frente ao líquido de compensação.

O líquido de compensação foi obtido transferindo-se 5 mL de metanol para balão volumétrico de 25 mL e adicionando-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina:água (2:8 v/v) e 2,5 mL de solução metanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 12 % m/v. Completou-se o volume com água. Homogeneizou-se e a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos. Transferiu-se a mistura para tubo falcon de 50 mL e centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubeta de quartzo e esta solução foi utilizada como líquido de compensação.

Foram construídas três curvas analíticas em diferentes dias. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de correlação linear (r^2) de cada curva foram calculados. As curvas obtidas foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p < 0,05$). Para análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (2007).

4.11.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intradia e precisão interdia.

Para determinação da precisão intradia foram analisadas seis amostras do mesmo lote de EICS frente a uma solução padrão de quercetina. Cerca de 2,5 g do EICS foram exatamente pesados em sextuplicata e procedeu-se ao preparo das soluções de leitura seguida de leitura em espectrofotômetro conforme descrito no método (item 4.10.1). Calculou-se o DPR para as réplicas ($n = 6$).

Na determinação da precisão interdia os fatores de variação testados foram tempo (dias) e analista. Foram analisadas doze amostras do mesmo lote de EICS, frente a duas soluções padrão de quercetina (uma solução padrão para cada dia). O procedimento foi executado em dois dias diferentes (seis análises em um dia e seis análises no outro dia), com um intervalo de sete dias entre as análises, e por dois analistas diferentes. Calculou-se o DPR % para as réplicas ($n = 12$).

De acordo com os critérios da ANVISA (BRASIL, 2003) o DPR deve ser $\leq 5,0$ % para que o método seja considerado preciso.

4.11.5 Exatidão

Para determinação da exatidão foi utilizado o método de adição de padrão. O método consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de referência quercetina a EICS, com o objetivo de determinar a porcentagem de recuperação.

Pesaram-se nove amostras com exatamente, cerca de 1,25 g de EICS. Adicionaram-se às três primeiras amostras exatamente cerca de 1,3 mg de quercetina padrão, com o intuito de contemplar o intervalo linear de baixa concentração (80% da concentração teórica do teste ou 0,0115 mg/mL). Às outras três amostras foram adicionados exatamente cerca de 1,9 mg de quercetina padrão, com o intuito de contemplar o intervalo linear de média concentração (100% da concentração teórica ou 0,0144 mg/mL). E, finalmente, às três últimas amostras, adicionou-se exatamente, cerca de 2,5 mg de quercetina padrão de, com o intuito de contemplar o intervalo linear de alta concentração (120% da concentração teórica do teste ou 0,0173 mg/mL).

Procedeu-se à análise de cada amostra conforme descrito no item 4.10.1.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

4.11.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada variando-se três parâmetros considerados críticos para a metodologia: o tempo de leitura, o comprimento de onda de leitura e a concentração da solução de cloreto de alumínio. Cada parâmetro foi avaliado em triplicata, e o resultado comparado com a análise de EICS utilizando as condições nominais descritas no item 4.10.1. Os resultados obtidos em cada condição foram comparados com os resultados adquiridos nas condições nominais por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

A variação dos parâmetros foi realizada como segue:

- Tempo de leitura: três amostras do mesmo lote foram preparadas conforme descrito no item 4.11.1 e as leituras foram realizadas em 420 nm, 25, 30 e 35 minutos após adição do AlCl_3 .
- Comprimento de onda: três amostras do mesmo lote foram preparadas conforme descrito no item 4.11.1 e as leituras foram realizadas 30 minutos após adição do AlCl_3 , em 418, 420 e 422 nm.
- Concentração da solução de AlCl_3 : três amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.11.1 e, para cada amostra foi utilizada solução metanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 10, 12 e 14% m/v.

4.11.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado a partir dos parâmetros da curva analítica, de acordo com a equação:

$$\text{LQ} = 10 * \text{DP}_i / \text{IC}$$

Onde DP_i é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003; ICH, 1994 e 1996).

4.11.8 Limite de detecção

O limite de quantificação foi determinado a partir dos parâmetros da curva analítica, de acordo com a equação:

$$LD = 3,3 * DP_i / IC$$

Onde DP_i é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva analítica (ICH, 1994 e 1996).

4.11.9 Quantificação de flavonoides totais em EECS e na fração EtOAc:MeOH

O teor de flavonoides totais foi quantificado em EECS e na fração EtOAc:MeOH, em triplicata, utilizando-se o método descrito em 4.1.11. Foram feitas adequações da tomada de amostra, de modo a obter concentrações das soluções dentro da linearidade e mais próximo possível de 100% da concentração de quercetina na curva analítica. Assim, foram utilizadas 0,5081 g de EECS e 0,2503 g da fração EtOAc:MeOH na quantificação.

4.12 Avaliação da atividade anti-inflamatória de EECS, frações derivadas e substância isolada (FLAV1)

Para avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato, das frações e da substância isolada utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os ensaios foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG conforme protocolo número 193/2010 (APÊNDICE)

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, de 25 a 30 g. Os animais foram deixados em sala com temperatura controlada a 27 ± 2 °C - correspondendo à zona de termoneutralidade dos camundongos – três dias antes do ensaio e durante o mesmo.

Cada protocolo utilizou 30 animais divididos em cinco grupos: controle negativo, controle positivo e três grupos teste. Os animais do grupo controle negativo foram tratados com salina, os animais do grupo controle positivo foram tratados com dexametasona e os animais dos três grupos teste foram tratados com três diferentes doses dos extratos, frações ou substâncias isoladas. Ração e água foram fornecidos *ad libitum* até oito horas antes do ensaio. Após esse período retirou-se a ração para os ensaios onde a administração foi realizada via oral. Para ensaios em que foi realizada a administração intraperitoneal, a ração e a água foram mantidas.

Administração de EECS e frações

O grupo controle negativo foi tratado com suspensão de carboximetilcelulose (CMC) 0,5 % m/v em solução salina. O grupo controle positivo foi tratado com dexametasona na dose de 10 mg/Kg em solução CMC 0,5% m/v em salina. EECS foi ensaiado nas doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg, enquanto as frações Hex, Hex:DCM, DCM, DCM:EtOAc, EtOAc, EtOAc:MeOH, MeOH, MeOH:AcOH foram avaliadas nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg. . As suspensões foram preparadas em salina, contendo CMC 0,5% m/v. As doses do extrato e das frações foram administradas *per os* (gavagem).

Administração do flavonoide 1 (FLAV 1)

FLAV1 foi administrado por via intraperitoneal, nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg, devido a pequena massa disponível. O restante do protocolo foi idêntico àquele descrito para EECS e frações.

Ensaio do edema de pata

Os animais foram pesados e o volume basal da pata posterior esquerda foi medido utilizando pletismômetro modelo 7140, Ugo Basile, Itália. Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume da pata. Essa célula é conectada a outra célula através de um sistema de vasos comunicantes. As células foram preenchidas com solução de baixa concentração eletrolítica. A pata de cada animal foi mergulhada na primeira célula o que resultou em um deslocamento da solução eletrolítica na segunda célula. A segunda célula contém um eletrodo que converte o deslocamento do líquido em volume, o qual é indicado no visor digital. A pata dos animais foi mergulhada até a articulação tíbio-tarsal, quando um pedal conectado ao aparelho foi acionado pelo experimentador, fixando, desta forma, o valor do volume observado. A divisão dos grupos para realização dos experimentos foi feita de forma que os volumes basais médios dos diferentes grupos fossem similares.

Uma hora após a administração das suspensões em teste, foi injetada na pata posterior esquerda dos animais 30 μ L de uma solução de carragenina 20 mg/mL.

Novas leituras dos volumes das patas foram realizadas em 1, 3 e 5 horas após a injeção do estímulo inflamatório. O extrato seco de *Costus spiralis* também foi avaliado por 24 horas, com leituras sendo realizadas em 1, 3, 5, 7, 9, 12 e 24 horas, com o intuito de verificar se a atividade continuava aumentando após a quinta hora e quando essa atividade se estabilizava.

As diferenças entre os volumes posteriores e os volumes basais iniciais foram utilizadas para determinar o efeito antiedematogênico, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média (BASTOS et al., 2008; MEDEIROS et al., 2007). Os dados foram analisados por meio de análise de variância simples, seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza a comparação de todos os grupos entre si. Foi adotado um nível de significância de 5% e o programa GraphPad Prism 5 for Windows foi utilizado na realização dos cálculos e construção dos gráficos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção fitoquímica

As principais classes de metabólitos especiais presentes em *C. spiralis* foram identificadas na prospecção fitoquímica.

Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD de gel sílica para EECS, utilizando-se os eluentes e reveladores seletivos indicados no item 4.5 (página 56). As classes de metabólitos investigadas foram flavonoides, taninos, antracênicos, saponinas, cumarinas, alcaloides, naftoquinonas, triterpenos, esteróis e cardenolídeos. Os resultados da prospecção fitoquímica encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Avaliação qualitativa das principais classes de metabólitos especiais no EECS

Metabólitos avaliados	Flav	Tan	Antrac	Sap	Cumar	Alc	Naftoq	Trit/est	Card
Resultado	+	+	-	+	-	-	-	+	-

Nota: Flav: flavonoides; Tan: taninos; Antrac: antracênicos; Sap: saponinas; Cumar: cumarinas; Alc: alcaloides; Naftoq: naftoquinonas; Trit: triterpenos; Est: esteroides; Card: cardenolídeos.

Flavonoides são comumente encontrados nas espécies do gênero *Costus* (SILVA et al, 2000; CHANG et al, 2011), tendo sido relatada para folhas de *C. spiralis* presença de 3,5–diidroxí–7,4’–dimetoxiflavona 3–O–neohesperidosídeo (**28**), canferol 3–O–neohesperidosídeo (**29**), canferídeo 3–O–neohesperidosídeo (**2**), quercetina 3–O–neohesperidosídeo (**3**) e tamarixetina 3–O–neohesperidosídeo (**1**) (ANTUNES et al, 2000). A presença de flavonoides em EECS foi evidenciada pela observação de fluorescência amarela e verde sob luz UV 365 nm. A **Figura 7** apresenta o cromatograma obtido para o EECS em comparação com as substâncias referência quercetina, canferol e rutina.

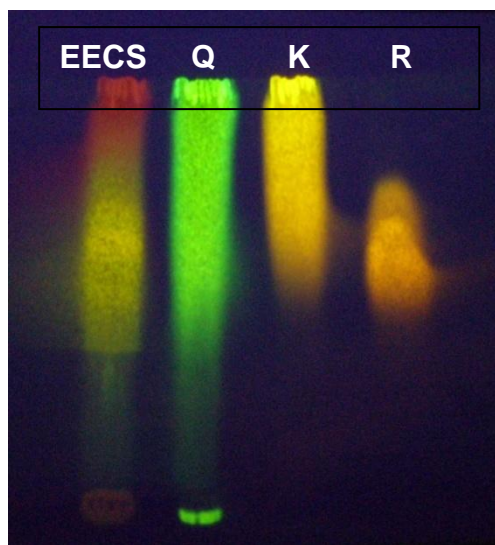


Figura 7 Cromatograma obtido por CCD de gel sílica para o extrato etanólico seco de *C. spiralis* (EECS) na avaliação de flavonoides. Eluente: butanol: ácido acético: água (40:10:50 v/v). Revelação: NP/PEG e luz UV₃₂₅ (Q = quercetina, K = canferol, R = rutina).

A presença de taninos foi evidenciada no EECS pelo surgimento de mancha negro esverdeada após uso de revelador cloreto férrico (Wagner et al, 1984).

Na avaliação de antracênicos e naftoquinonas foram verificadas manchas de mesmo Rf que aquelas obtidas para as substâncias referência utilizadas (aloína e lapachol). No entanto, tais manchas apresentaram coloração completamente diferentes das colorações observadas para os padrões, indicando a ausência de antracênicos e naftoquinonas no EECS. Tal resultado confere com a literatura científica da espécie, na qual não se faz menção a esses grupos de metabólitos.

Saponinas foram identificadas em EECS pela presença de manchas de coloração similares àquela obtida para mistura de saponinas purificadas. A **Figura 8** apresenta o cromatofolha obtida nessa caracterização. As saponinas (3 β ,25*R*)-26-(β -D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxiurost-5-en-3-il-O-D-apio- β -D-furanosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosideo (**26**) e (3 β ,25*R*)-26-(β -D-glicopiranosiloxi)-22-hidroxiurost-5-en-3-il O-D-apio- β -D-furanosil-(1 \rightarrow 4)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosideo (**27**) foram isoladas de rizomas de *C. spiralis* (SILVA & PARENTE, 2004); no entanto é a primeira vez que metabólitos dessa classe são detectados nas folhas. Outras espécies do gênero

Costus apresentaram saponinas, mas sempre foram isoladas de rizomas (INOUE et al, 1996; QIAO et al, 2002; SILVA et al, 1999 a e b).

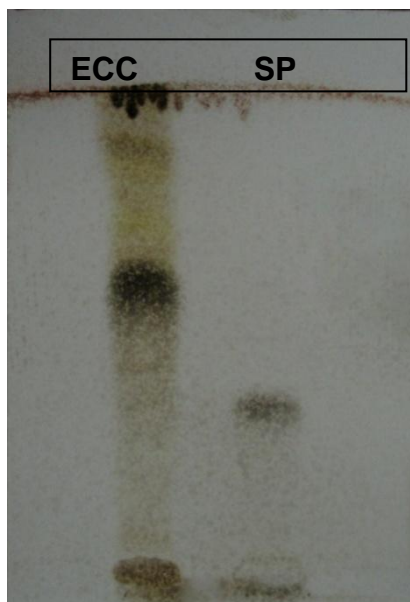


Figura 8 Cromatograma obtido por CCD de gel sílica para EECS na identificação de saponinas. Eluente: Clorofórmio: MeOH: água (64:50:10 v/v). Revelador: ácido sulfúrico 5% v/v em etanol seguido de vanilina 1% em etanol (SP = mistura de saponinas).

Alcaloides e cumarinas não foram encontrados em EECS, o que corrobora dados da literatura científica para *C. spiralis*. E para outras espécies do gênero *Costus*.

Triterpenos e esteroides são substâncias com ampla distribuição no reino vegetal. Utilizou-se o reagente Libermann–Burchard para caracterização de terpenos e esteróis. Este reagente revela triterpenos pentacíclicos com manchas pardas a vermelhas. Esteroides são caracterizados por manchas azuis que se tornam verdes com o tempo. A **Figura 9** mostra a presença de manchas pardas e de manchas verdes (inicialmente azuis), o que evidencia a presença de triterpenos e esteróis nas folhas de *C. spiralis*. Apesar de nunca terem sido descritos nessa espécie, terpenos e esteróis são comuns em espécies da família Costaceae (BÖHME et al, 1997; QIAO et al, 2002; ELISA et al, 2009 a e b; TAIWO & BOLANLE, 2003).

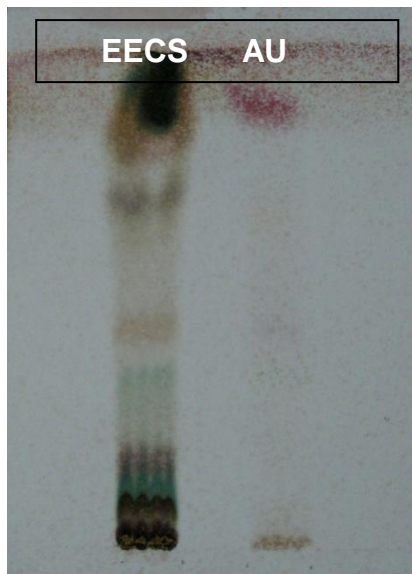


Figura 9 Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica do EECS na caracterização de terpenos e esteroides. Eluente: DCM: EtOAc (1:1 v/v). Revelador: reagente Libermann-Burchard (AU =Ácido ursólico).

Utilizou-se digoxina como substância de referência para a prospecção de cardenólidos. EECS não apresentou nenhuma mancha com coloração ou Rf próximo àquelas observadas para o padrão, o que caracteriza a ausência desse grupo de metabólitos no extrato. Cardenólídeos também não foram descritos nas espécies do gênero.

5.2 Fracionamento de EECS e obtenção de perfis cromatográficos por CLAE-FR para o extrato e frações

O fracionamento preliminar de EECS teve como objetivo obter frações de complexidade menor, para avaliação no ensaio biológico. As frações obtidas, as massas e os rendimentos encontram-se discriminados na **Tabela 7**. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos em CCD de sílica gel.

As frações obtidas tiveram sua atividade anti-inflamatória avaliada no modelo experimental do edema de pata induzido por carragenina. Os resultados da atividade anti-inflamatória do extrato e das frações são apresentados e discutidos no item 5.6

Tabela 7 - Massas e rendimentos obtidos no fracionamento preliminar de EECS.

Frações	Massas obtidas (g)	Rendimentos (%)
F Hex	1,568	3,45
F Hex:DCM	5,402	11,88
F DCM	1,229	2,70
F DCM:EtOAc	4,252	9,35
F EtOAc	2,640	5,72
F EtOAc:MeOH	26,590	58,44
F MeOH	2,521	5,54
F MeOH: AcOH	0,407	0,89

As análises por CLAE de fase reversa (CLAE-FR) e detecção por arranjo de diodos (DAD), utilizando gradiente linear de água e acetonitrila permitiram avaliar qualitativamente a composição química de EECS e das frações oriundas do mesmo.

A análise do perfil cromatográfico de EECS (**Figura 10**) revela que a maior parte dos picos está presente no intervalo de 0 a 20 minutos, indicando que o mesmo é constituído principalmente por substâncias polares. A **Figura 10** também apresenta expansões de regiões do cromatograma (0 a 5 minutos e 5 a 20 minutos), onde se concentram a maioria das substâncias de EECS. A **Figura 11** mostra os espectros no UV dos picos majoritários do cromatograma, assinalados na **Figura 10**.

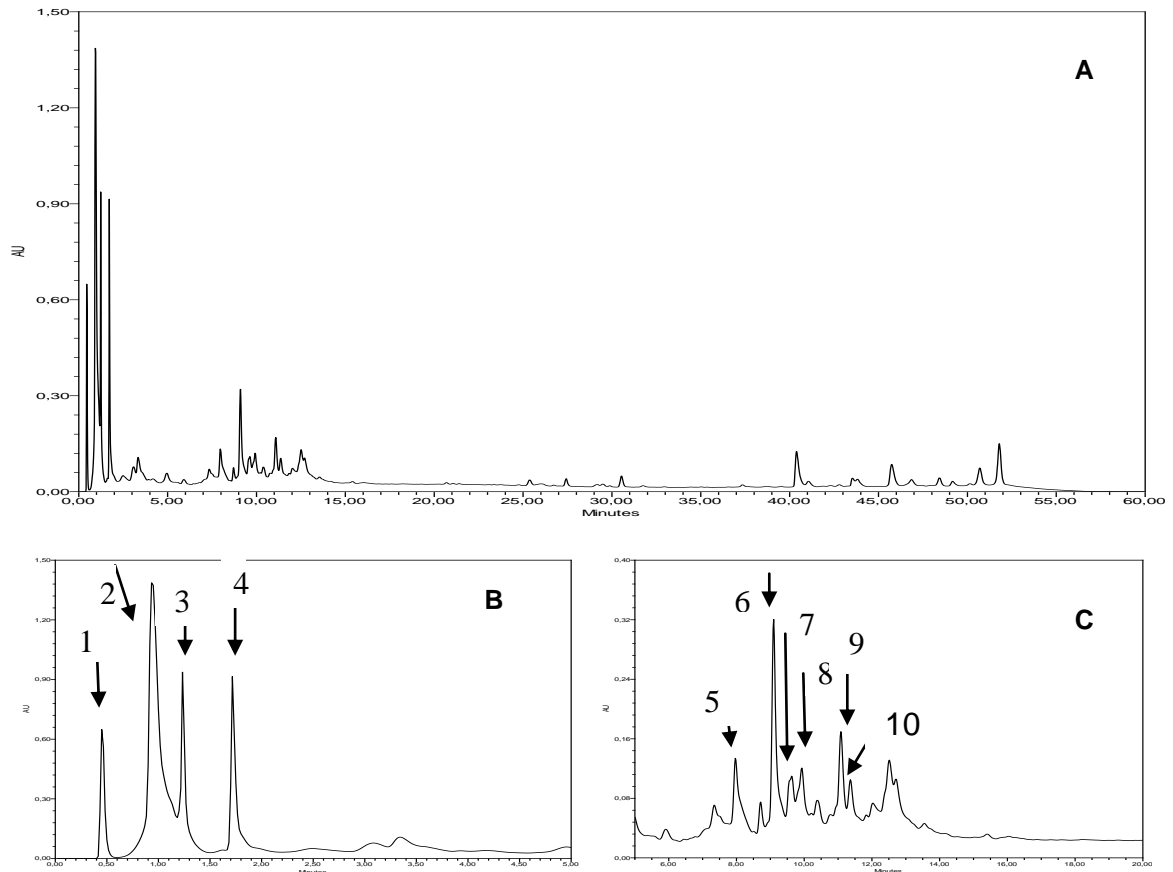


Figura 10 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para EECS. (A) Cromatograma registrado de 0 a 60 min.; (B) expansão do cromatograma (tempo de retenção de 0 a 5 minutos) e (C) expansão do cromatograma (tempo de retenção de 5 a 20 minutos). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.7 (pág. 61)

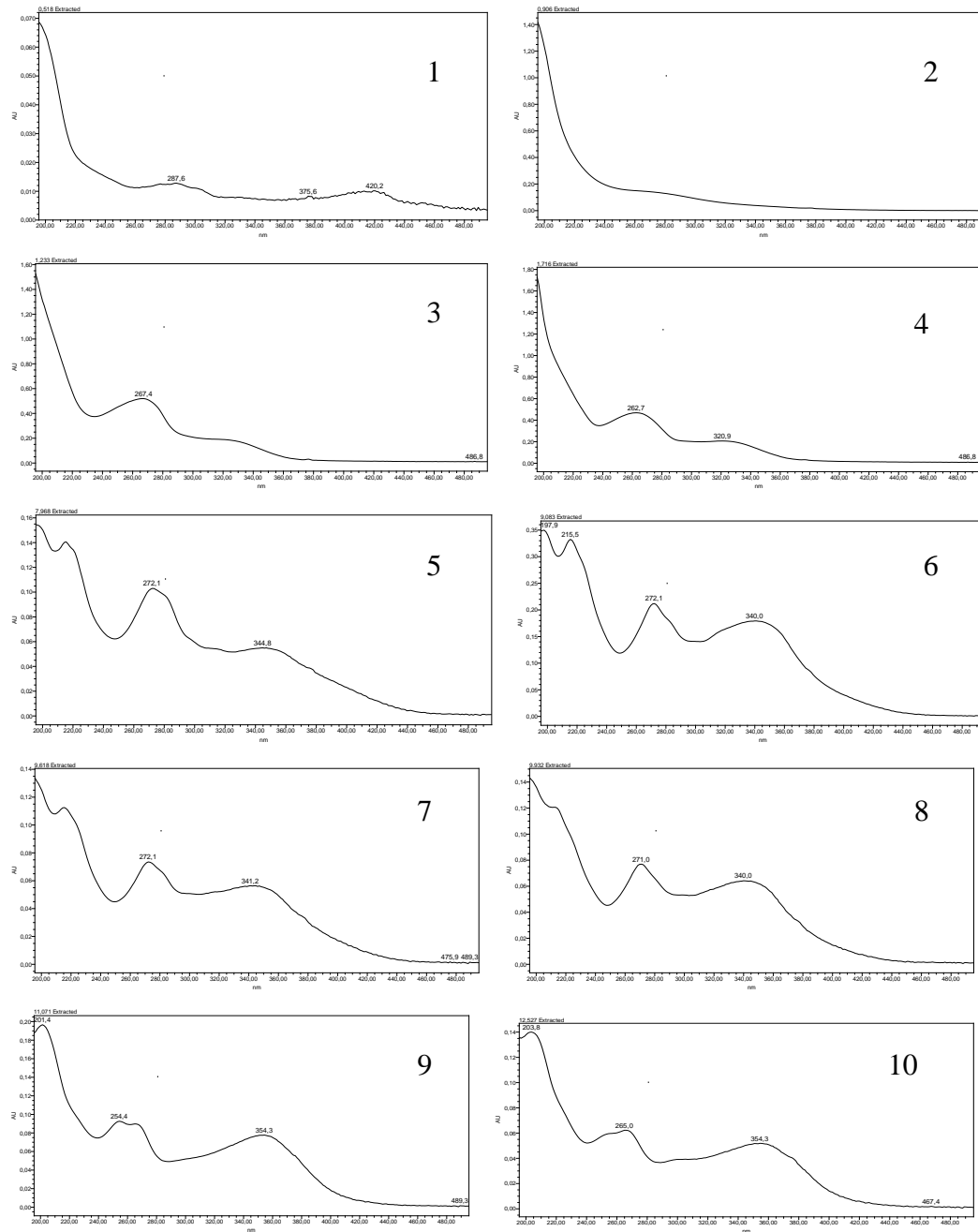


Figura 11 Espectros no UV registrados pelo detector de arranjo de diodos para picos assinalados no cromatograma de EECS (Figura 11). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.7, pág. 61.

Os espectros de absorção no UV dos flavonoides presentes em *C. spiralis* (Figura 11) são compatíveis com flavonas e flavonóis, com máximos de absorção da banda I abaixo e acima de 350 nm, respectivamente (MABRY, MARKHAM & THOMAS, 1970). Os espectros de UV de flavonóis e flavonas em metanol exibem dois picos de maior absorção no intervalo de λ 240 a 400 nm, sendo denominados de banda I (λ 300 – 380 nm) e banda II (λ 240 – 280 nm). A banda I (cromóforo cinamoíla) está

associada à absorção do anel B do esqueleto flavonoídico e a banda II (cromóforo benzoíla) à absorção devida ao anel A (**Figura 12**). Os flavonóis, de uma maneira geral, apresentam o comprimento de onda de absorção da banda I superior a 350 nm, devido à presença da hidroxila na posição 3, que aumenta a densidade eletrônica desse cromóforo. Ao contrário, as flavonas apresentam comprimento de onda de absorção da banda I abaixo de 350 nm (MABRY, MARKHAM & THOMAS, 1970). Dos picos assinalados na **Figura 10**, apenas os flavonoides dos picos 9 e 10 apresentam perfis de absorção de flavonol com λ máximo da banda I em 354,3 nm para ambos. Os demais flavonoides assinalados apresentam λ máximo da banda I em valores inferiores a 340 nm. Tal fato difere do encontrado na literatura para espécie uma vez que os cinco flavonoides isolados e identificados por Antunes et al. (2000) são favonóis.

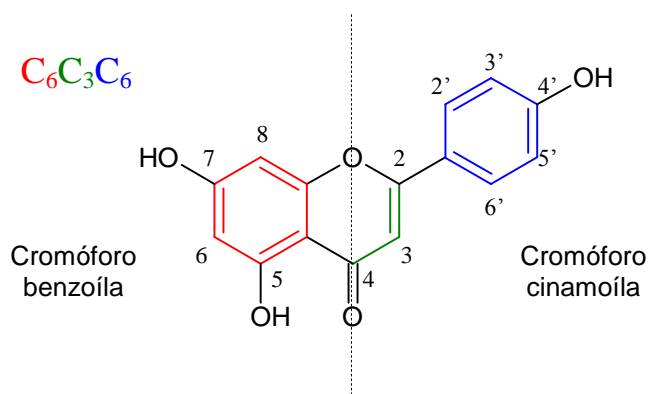


Figura 12 Esqueleto básico de flavonoide e seus cromóforos.

Com o objetivo de identificar a presença de flavonoides e outros metabólitos de ampla distribuição, soluções de referência de quercetina, rutina, canferol, catequina, epicatequina, ácido gálico e ácido cafeico foram analisadas, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas. Os cromatogramas obtidos para estas substâncias e seus respectivos espectros de absorção no UV estão dispostos nas **Figuras 13 e 14**. A comparação dos perfis cromatográficos e espectros no ultravioleta dessas substâncias com aqueles obtidos para EECS nos permite inferir que nenhuma delas está presente no extrato, pois não observou-se semelhanças nos tempos de retenção e nos espectros UV. No entanto, heterosídeos da quercetina e canferol, já foram isolados de folhas de *C. spiralis* (ANTUNES et al.,

2000). O padrão de absorção dos espectros de UV das substâncias presentes em EECS é semelhante aos dos flavonoides utilizados como referência.

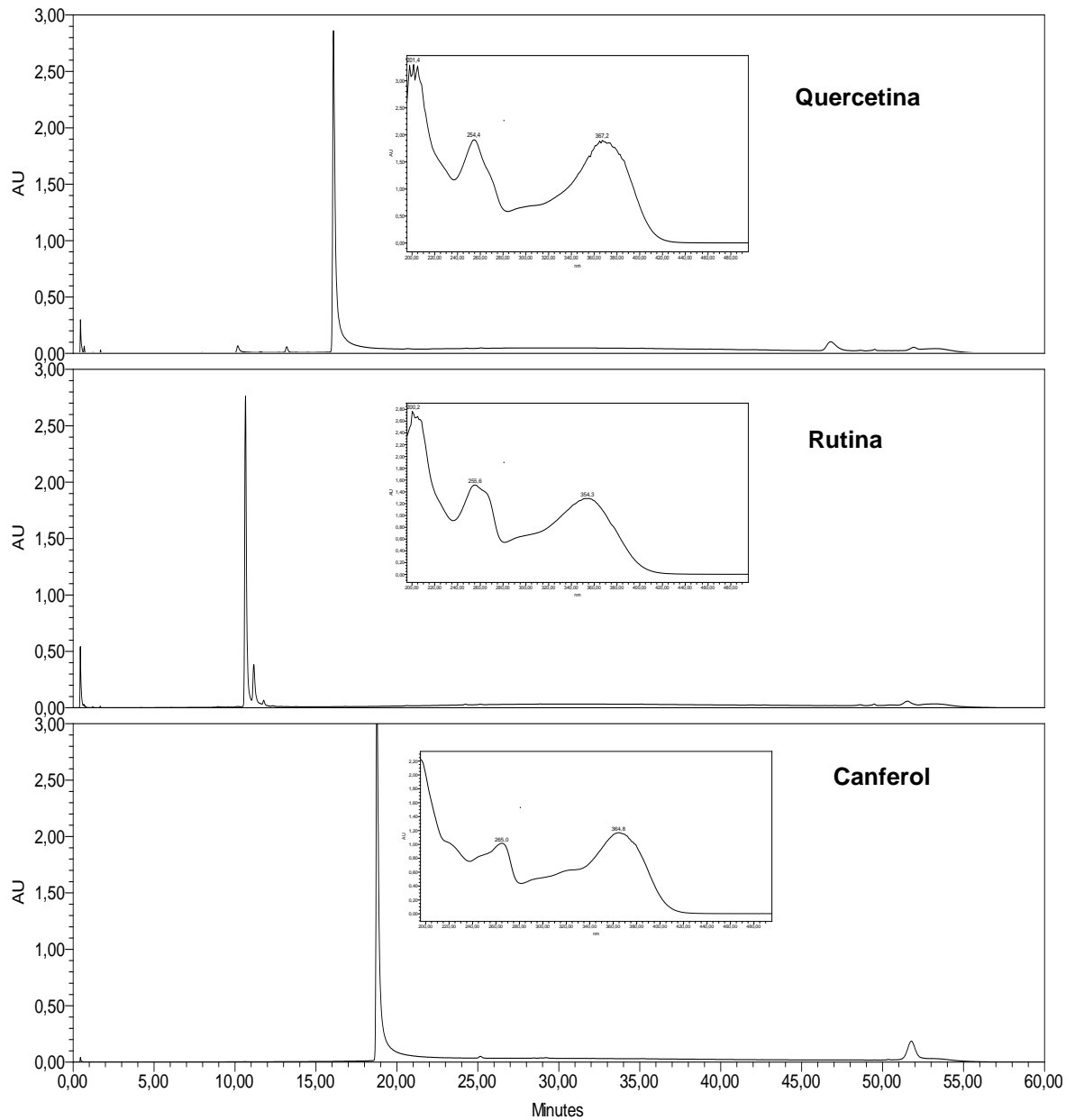


Figura 13 Perfis cromatográficos e espectros no UV λ 210 nm de polifenóis de referência: quercetina, rutina e canferol. Condições cromatográficas ver item 4.7, pág. 61.

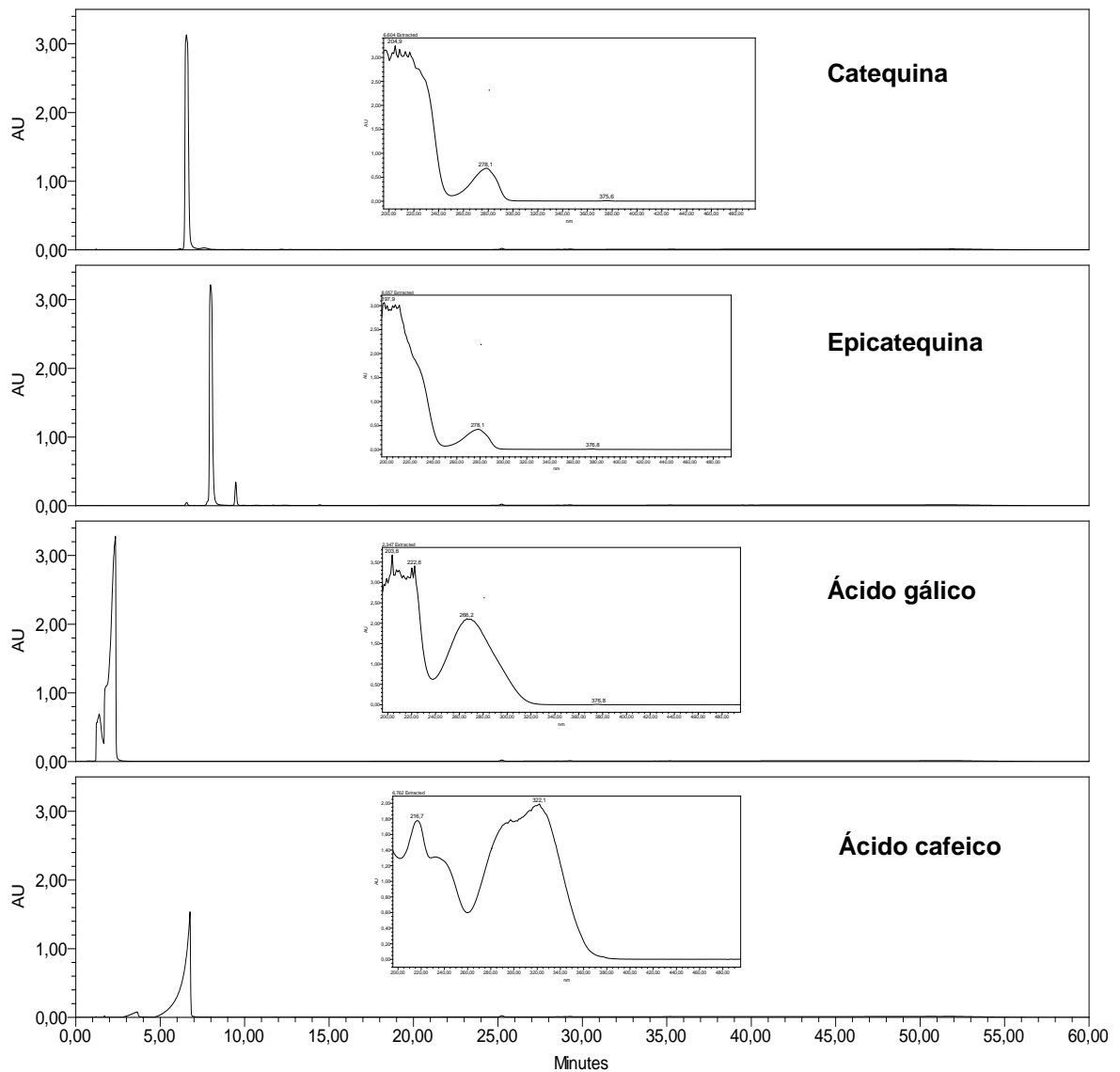


Figura 14 Perfis cromatográficos e espectros UV de polifenóis de referência: catequina, epicatequina, ácido gálico e ácido cafeico. Condições cromatográficas ver item 4.7, pág. 61.

O fracionamento de EECS resultou em frações com composições químicas distintas do extrato, indicando a eficácia da separação (**Figuras 15 e 16**). Nas frações onde foram utilizados solventes menos polares (Hex, Hex:DCM, DCM, DCM:EtOAc), como era previsto, predominaram as substâncias de menor polaridade, com tempos de retenção superiores a 40 min (**Figura 15**). Substâncias de elevada polaridade (TR inferior a 2 min) foram detectadas em todas as frações.

A predominância de flavonoides em EECS era prevista uma vez que a literatura relata o isolamento de cinco flavonoides na espécie (Antunes et al., 2000), conforme descrito da Revisão da Literatura Científica. Os espectros no UV registrados para as

substâncias correspondentes aos picos 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 (**Figura 10**) demonstram se tratar de substâncias flavonoídicas. Os picos 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam a banda I com λ inferior a 350 nm, sugerindo tratar-se de flavonas. Por outro lado, os picos 9 e 10 apresentam banda I com λ superior a 350 nm, indicando a presença de flavonóis. A fim de obter uma melhor caracterização dos constituintes de EECS e da fração EtOAc:MeOH (1:1) estas foram analisadas por CLAE com detector de espectrometria de massa (item 5.3, pág. 89).

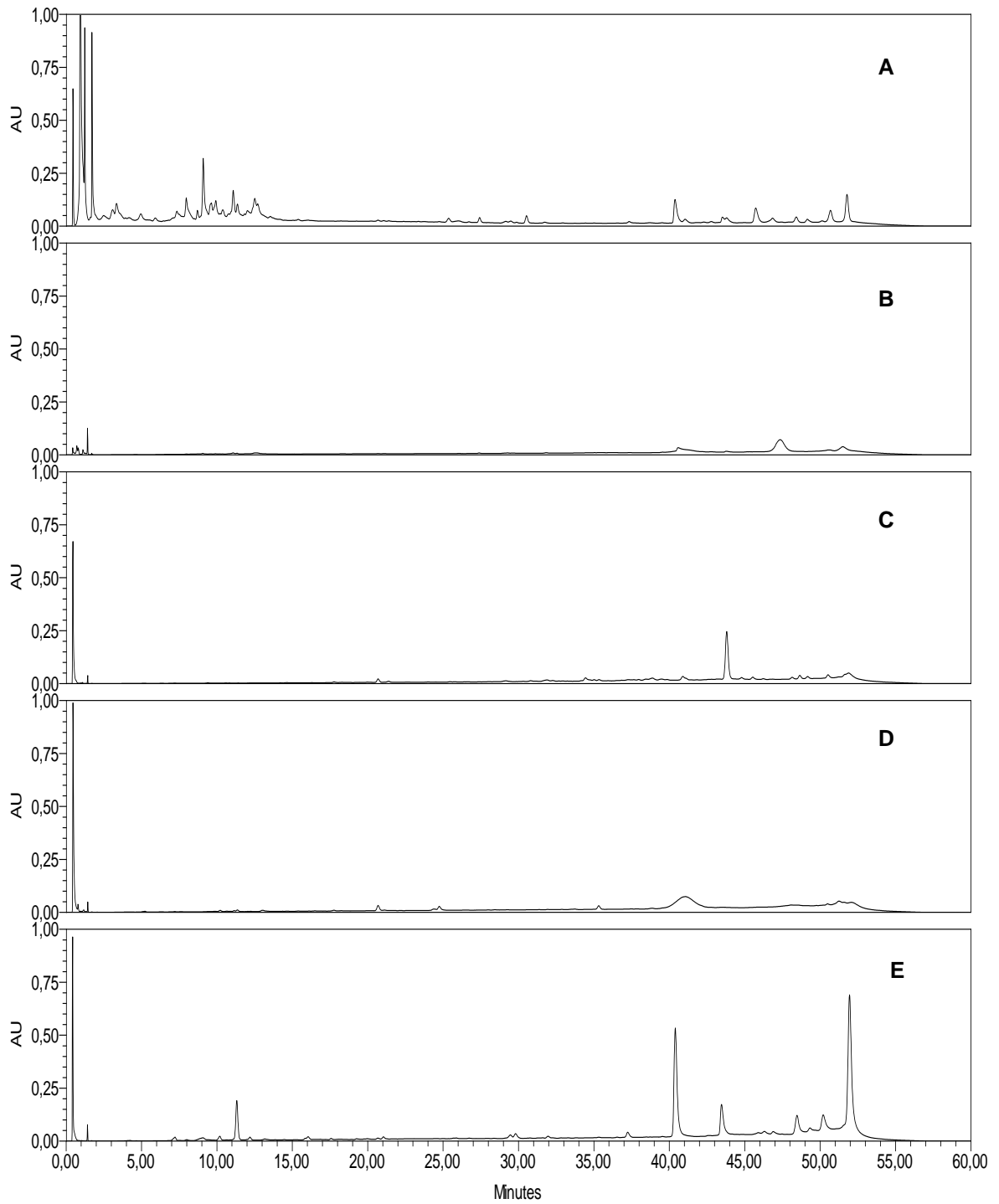


Figura 15 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para EECS (A) e frações Hex (B), Hex:DCM (C), DCM (D), DCM:EtOAc (E). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7, pág. 61.

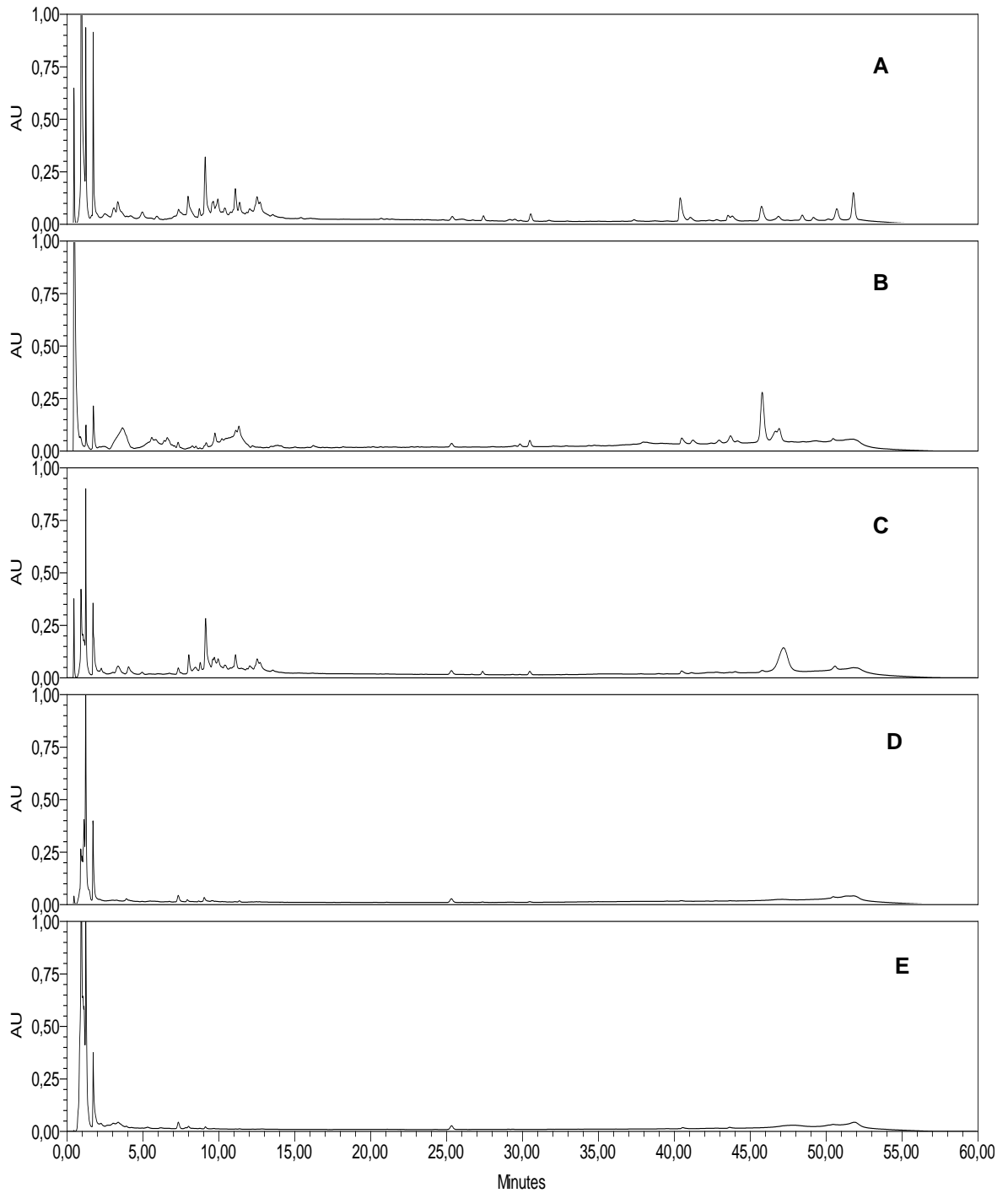


Figura 16 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE- DAD para EECS (A) e frações EtOAc (B), EtOAc:MeOH (C), MeOH (D), MeOH:AcOH (E).Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7. pág 61.

5.3 Caracterização dos flavonoides de EECS por CLAE-MS/MS

Os flavonoides presentes em EECS e na fração EtOAc:MeOH (1:1) foram analisados por CLAE-DAD acoplada à espectrometria de massas (MS) no modo positivo de ionização. As fragmentações das substâncias correspondentes aos picos principais foram avaliadas. A **Figura 17** apresenta os cromatogramas obtidos para EECS e para a fração EtOAc:MeOH (1:1), monitorada por CLAE-DAD em 254 nm.

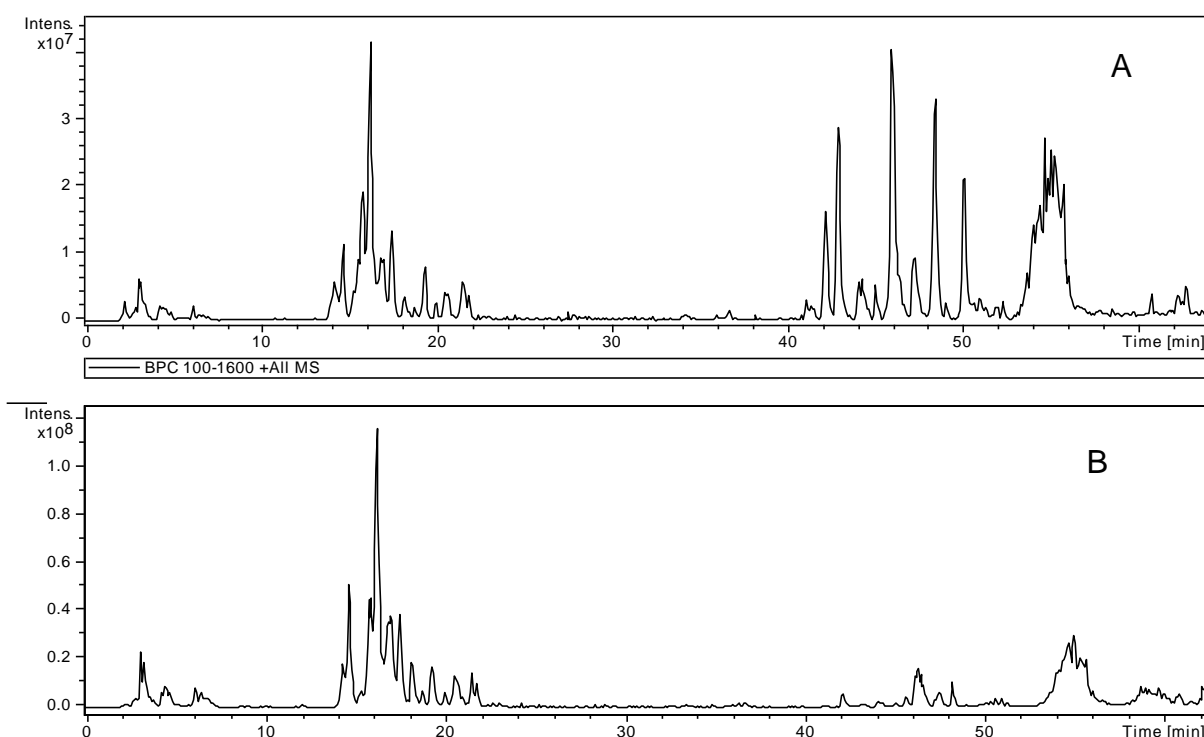


Figura 17 Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD acoplado a espectrômetro de massas para EECS (A) e fração EtOAc:MeOH (1:1) (B).

Baseado nas fragmentações observadas e nas estruturas dos flavonoides já relatados para a espécie por Antunes et al. (2000) foi possível identificar a presença de tamarixetina-3-O-neohesperidosideo (**1**) em EECS, cujo espectro de massas está representado na **Figura 18**.

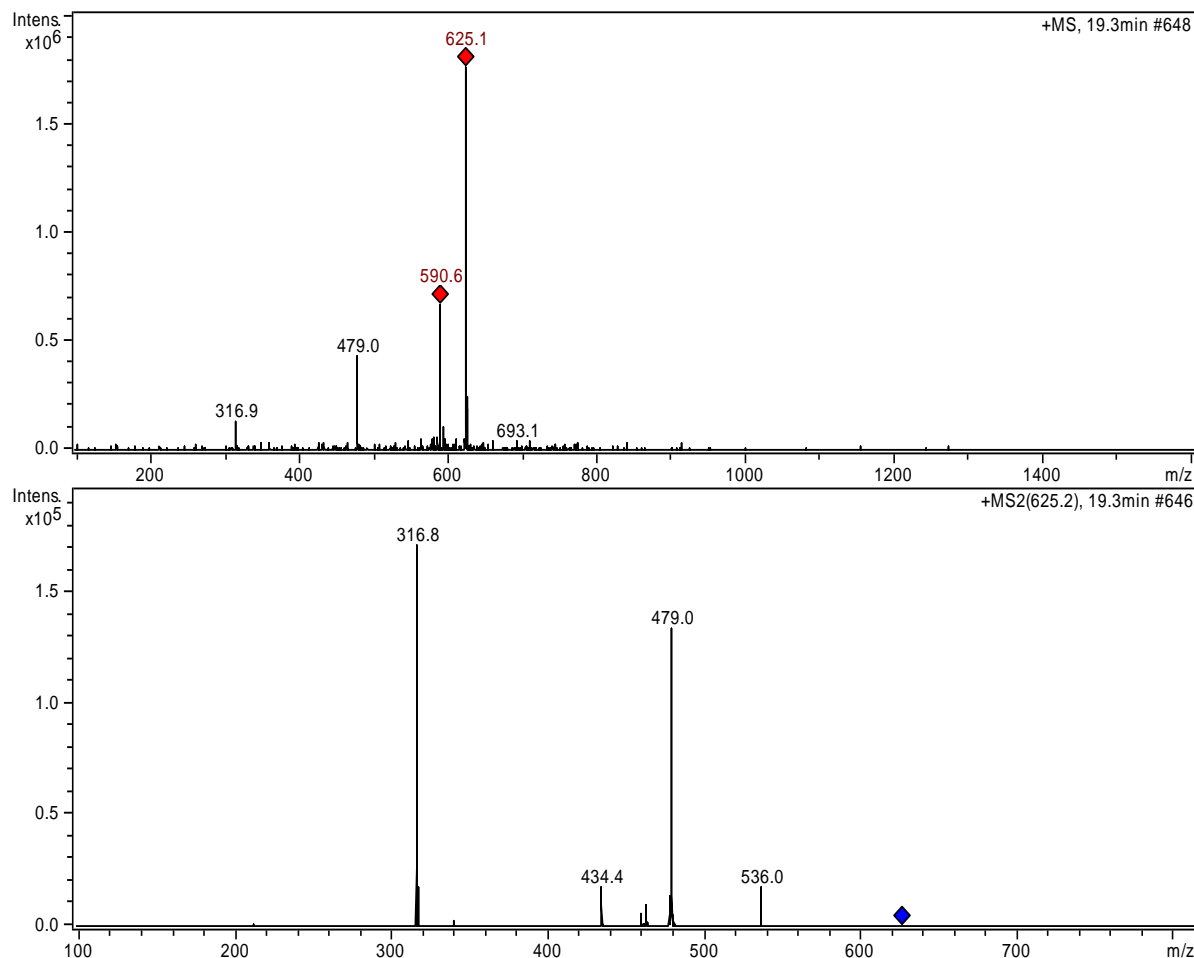


Figura 18 Espectros +MS (A) e +MS₂ (B) obtidos para o pico com tempo de retenção de 19,3 minutos no cromatograma de CLAE-DAD-MS registrado para EECS

O pico $[M+H]^+$ com m/z 625,1 aparece no espectro +MS (**Figura 18**). Tamarixetina-3-*O*-neohesperidosídeo apresenta duas moléculas de açúcar, sendo uma de glicose, ligada à tamarixetina através de ligação *O*-glicosídica, e outra de ramnose, ligada à glicose. A ramnose é mais susceptível à quebra, uma vez que está ligada à glicose e não diretamente à genina. A quebra da ramnose leva à formação do pico m/z 479,0 e a perda seqüencial de glicose forma a aglicona tamarixetina com m/z 316,8. O espectro +MS₂ apresenta, ainda, um pico com m/z 434,4 referente à perda consecutiva de água e monóxido de carbono. As fragmentações observadas são compatíveis com fragmentações observadas para flavonóis glicosilados, onde ocorre primeiramente a perda de unidades monossacarídicas, seguida da perda de água e de monóxido de carbono (TSIMOGIANNIS et al., 2007). A **Figura 19** mostra o esquema de fragmentação proposto para tamarixetina-3-*O*-neohesperidosídeo.

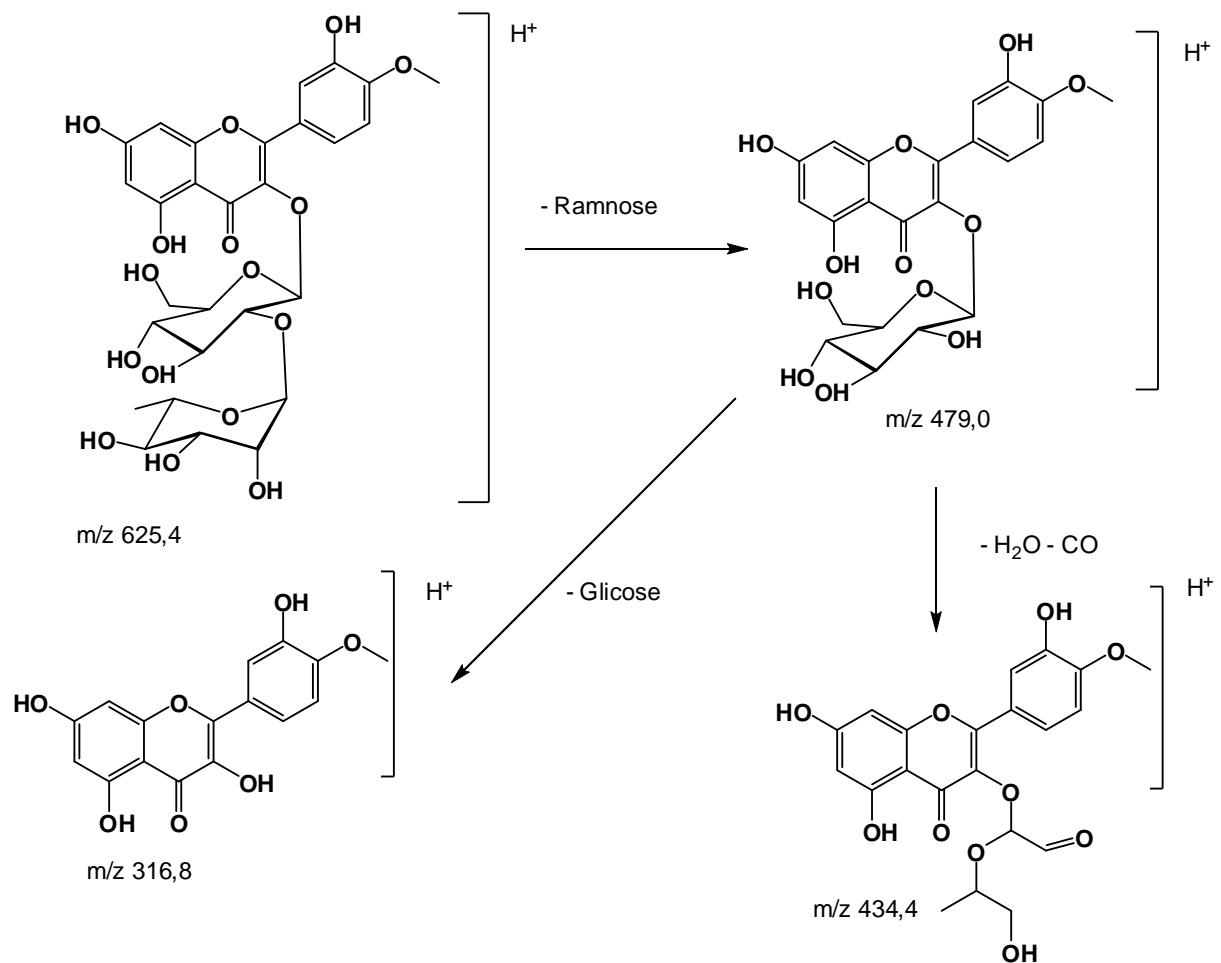


Figura 19 Esquema de fragmentação proposto para tamarixetina-3-O-neohesperidosídeo

Nenhum outro flavonol identificado por Antunes et al. (2000) correspondeu às fragmentações observadas nos espectros obtidos para os constituintes de EECS.

5.4 Isolamento e caracterização das substâncias isoladas a partir da fração EtOAc:MeOH (1:1)

O refracionamento da fração EtOAc:MeOH (1:1) levou ao isolamento de um flavonoide denominado, a princípio, flavonoide 1 (FLAV1).

FLAV1 foi isolado a partir da fração EtOAc:MeOH (1:1) por CLAE em escala preparativa, utilizando coluna de ODS. Os cromatogramas registrados para EECS e para a fração EtOAc:MeOH (1:1) indicam FLAV1 como pico majoritário entre os compostos flavonoídicos (**Figura 20**).

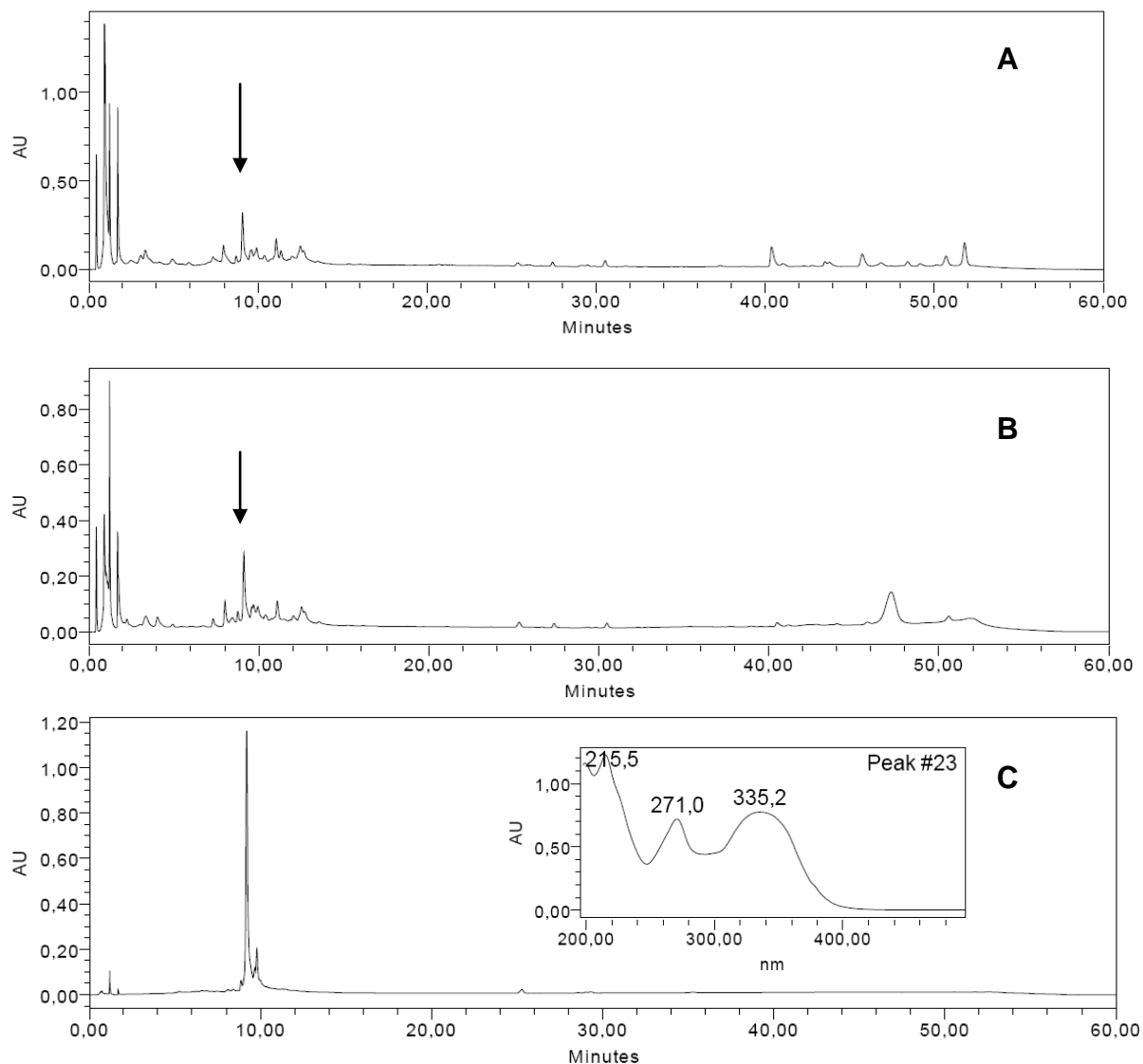


Figura 20 Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 210 nm para EECS (A), fração EtOAc:MeOH (1:1) (B) e FLAV1 (C). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.7 pág 61.

Inicialmente foi utilizada espectroscopia de absorção na região do UV para caracterizar a estrutura de FLAV1. O espectro de FLAV1 apresentou bandas intensas com máximos de absorção em 271 e 335,2 nm (**Figura 20 C**). O máximo de absorção da banda I permite diferenciar flavonóis de flavonas. As flavonas apresentam λ máximo da banda I entre 304-350 nm enquanto a banda I de flavonóis

apresenta λ máximo entre 352 e 385 nm (MABRY et al., 1970). Assim, o λ máximo da banda I do FLAV1 em 335,2 nm indica tratar-se de uma flavona.

Os efeitos causados no espectro UV de flavonas e flavonóis após adição de metóxido de sódio (NaOMe) fornecem informações sobre a presença ou ausência de grupos hidroxila (OH) livres na molécula. A natureza fenólica de FLAV1 foi evidenciada pelo deslocamento batocrômico observado para ambas as bandas após adição do NaOMe: banda I de 271,25 nm para 281,25 nm e banda II de 335,2 nm para 397,5 nm (**Figura 21**). Efeitos batocrômicos nas bandas I e II sem diminuição da intensidade indicam presença de OH livre nos anéis A e B. Observa-se ainda na **Figura 21** que não houve alteração do espectro 5 minutos após adição de NaOMe. Além disso, a adição de ácido clorídrico (HCl) à cubeta na qual se adicionara previamente a base levou à reconstituição do espectro inicial. A estabilidade frente à adição de base forte e a regeneração do espectro inicial são característicos de flavonas (MABRY et al., 1970).

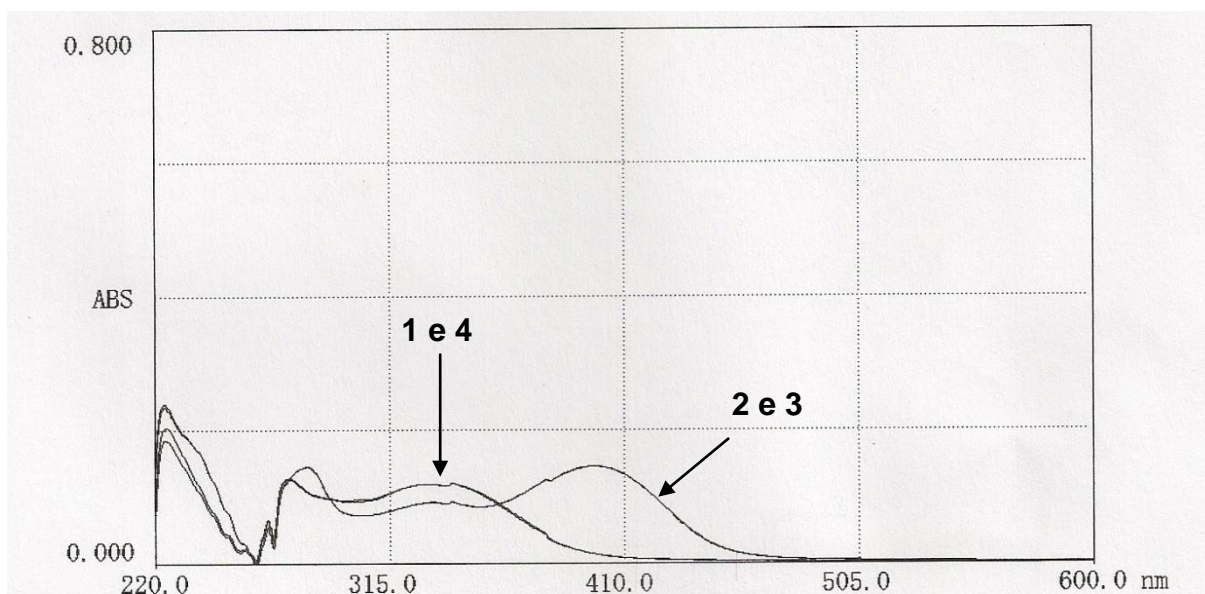


Figura 21 Espectro de varredura de absorção no UV obtido para FLAV1 frente ao aditivo NaOMe. (1) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL; (2) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL após adição de NaOMe; (3) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL 5 minutos após adição de NaOMe; (4) Solução metanólica de FLAV1 após adição de NaOMe seguida de HCl.

Flavonas e flavonóis com hidroxilas das posições C3 ou C5 formam complexos com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) estáveis que não regeneram após adição de HCl. Por

outro lado, a instabilidade do complexo após adição do ácido indica presença de sistema *orto*-diidroxil.

O espectro no UV obtido após adição de AlCl_3 à solução metanólica de FLAV1 (**Figura 22**) mostra um efeito batocrômico na banda I e divisão da banda II em duas (277,5 e 302,5 nm). A estabilidade do complexo após adição de HCl indica presença de hidroxila nas posições C3 e/ou C5. Considerando que o máximo de absorção da banda I registrado para FLAV1 é compatível com uma flavona, a reação com AlCl_3 indica hidroxila na posição C5.

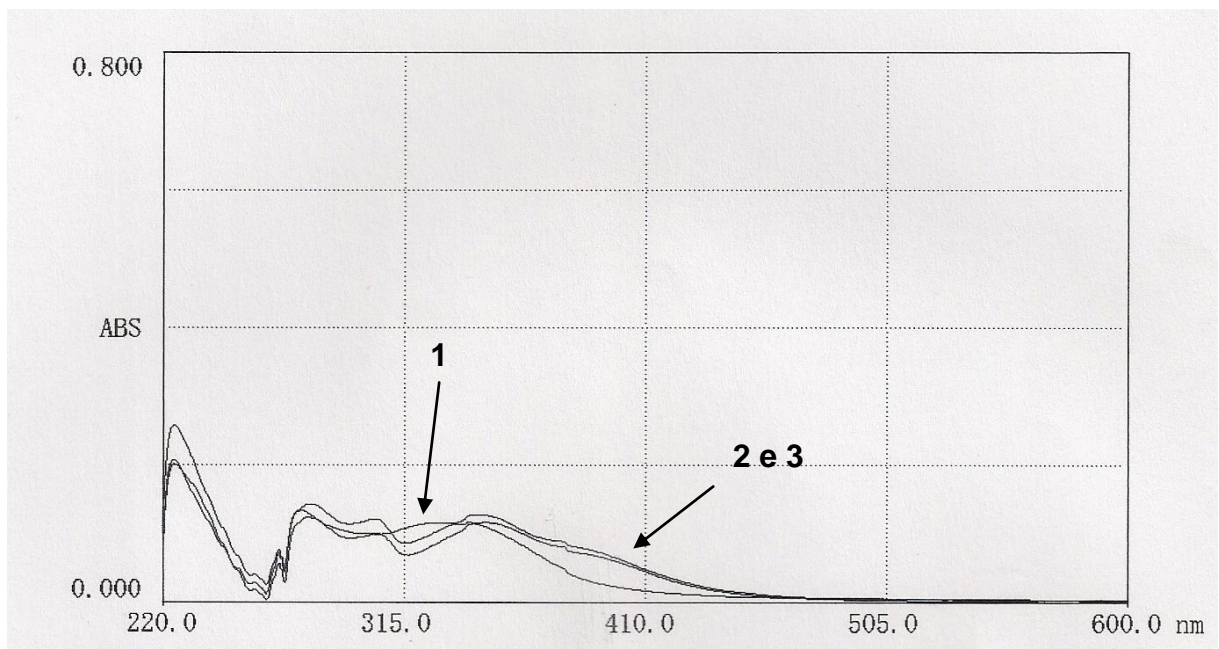


Figura 22 Espectro de varredura de absorção no UV obtido para FLAV1 frente ao aditivo AlCl_3 . (1) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL; (2) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL após adição de AlCl_3 ; (3) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL após adição de AlCl_3 seguida de HCl.

O acetato de sódio (NaOAc) é uma base fraca e, portanto, capaz de ionizar hidroxilas de caráter ácido acentuado, ou seja, o uso deste aditivo possibilita identificar a presença de hidroxilas nas posições C3, C7 e C4'. Flavonas e flavonóis contendo OH livre na posição C7 apresentam efeito batocrômico entre 5 e 20 nm na presença de NaOAc (MABRY et al., 1970). A adição de NaOAc à solução metanólica de FLAV1 resultou em deslocamento batocrômico de 7,5 e 53 nm (**Figura 23**) nas bandas II e I, indicando a presença de hidroxilas nas posições C7 e C4', respectivamente. Após adição de ácido bórico (H_3BO_3) os máximos de absorção das

bandas I e II foram regenerados indicando a inexistência de grupos *orto*-diidroxí. Dessa forma, pode-se inferir sobre a presença de hidroxila nas posições C5, C7 e C4' de FLAV1.

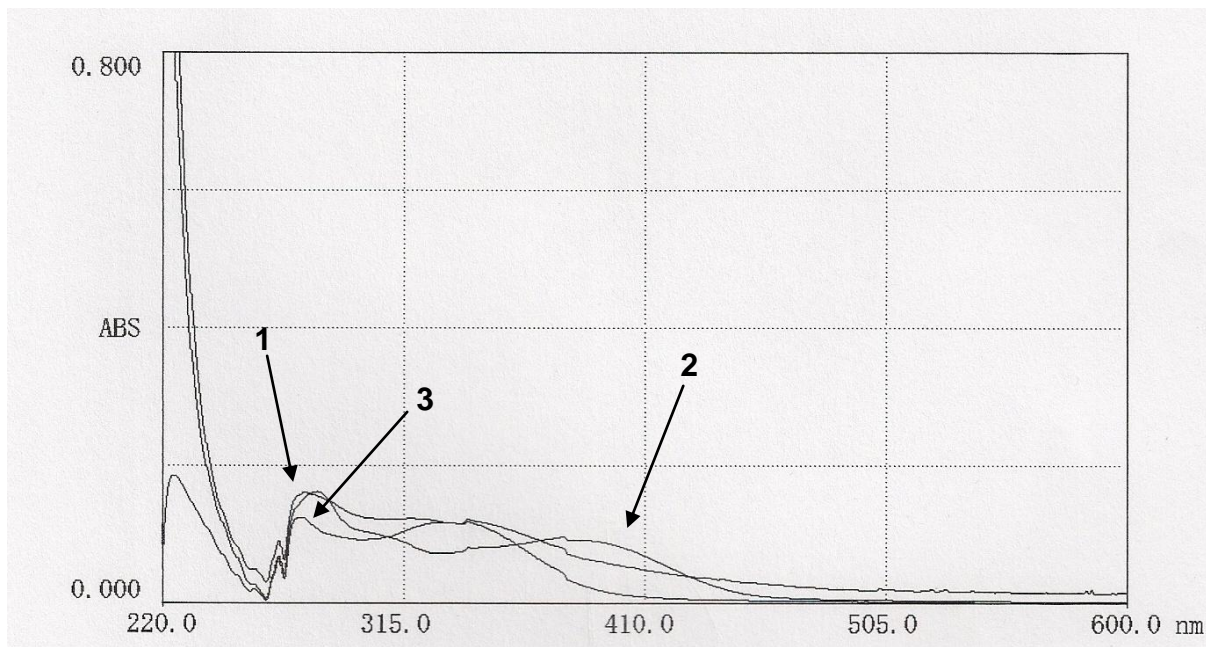


Figura 23 Espectro de varredura de absorção no UV obtido para FLAV1 frente ao aditivo NaOAc. (1) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL; (2) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL após adição de NaOAc; (3) Solução metanólica de FLAV1 0,2 mg/mL após adição de NaOAc seguida de H_3BO_3 .

Análises cromatográficas de FLAV1 por CLAE e CCD de sílica gel indicaram tratar-se de um glicosídeo, tendo em vista a polaridade do mesmo. Desta forma, a fim de identificar a aglicona e os açúcares constituintes de FLAV1, procedeu-se à hidrólise ácida e análise dos produtos obtidos por CCD de sílica gel (item 4.10, pág. 64). O cromatograma obtido possibilitou a identificação de L-arabinose e D-glicose.

O espectro no IV registrado para FLAV1 (**Figura 24, Tabela 8**) evidencia, a natureza aromática da substância pela presença de bandas de absorção em 1610, 1574, 1510 e 1430 cm^{-1} , atribuídas a estiramento C=C de anel aromático. A banda em 1650 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de carbonila α , β insaturada, característica de flavona. A presença de hidroxila foi indicada por uma banda larga centrada em 3246 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H. A banda de absorção em 2916 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial assimétrica de C-H de grupos metila e metileno, enquanto a banda em 1358 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de C-O de fenol. As bandas intensas e largas entre 1100 e 1000 cm^{-1} , características de deformação

axial de C-O, confirmam a presença de hidroxilas alcoólicas em FLAV1 (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2005). Finalmente, a banda em 834 cm^{-1} de deformação angular C-H fora do plano, indicativa de anel 1,4 dissustituído, confirma a substituição da posição C4' de FLAV1 (PAVIA, LAMPMAN & KRIS, 2001).

Tabela 8 – Atribuições das principais absorções do espectro no IV de FLAV1.

ν (cm^{-1})	Atribuições
3246	Deformação axial de O-H de álcool/fenol
2916	Deformação axial de C-H de grupos metila e metileno
1650	Deformação axial de C=O de cetona α , β insaturada
1610, 1574, 1510 e 1430	Deformação axial de C-C de aromático
1358	Deformação axial de C-O de fenol
1100-1000	Deformação axial C-O de álcool
834	Deformação angular C-H fora do plano de anel 1,4 dissustituído.

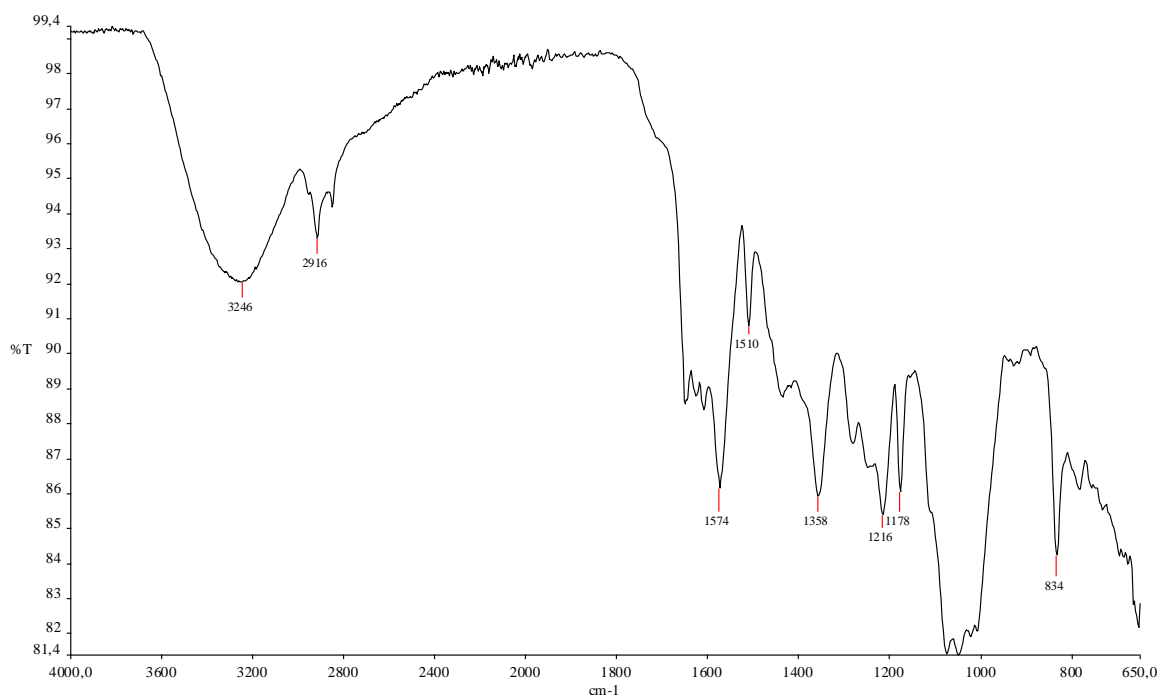


Figura 24 Espectro no IV obtido para FLAV1

A análise dos dados de RMN obtidos para FLAV1 permitiram caracterizar a estrutura do flavonoide e confirmar as informações fornecidas pelas técnicas anteriores. No espectro de RMN de ^1H (Figura 26) observa-se a presença de um duplete centrado

em δ 8,03 ppm ($J = 10,0$ Hz, 2H) e outro centrado em δ 6,89 ppm ($J = 10,0$ Hz, 2H), o que caracteriza o sistema AA'XX' do anel B, confirmando que o mesmo encontra-se *para*-substituído em C4'. Os simpletos em δ 13,67; 10,40 e 7,32 ppm foram atribuídos às hidroxilas em C5, C4' e C7, respectivamente, enquanto o simpleto em δ 6,82 ppm foi atribuído ao hidrogênio olefínico ligado a C3. Estes dados confirmam as informações sobre o esqueleto básico de FLAV1 obtido pelos dados espectrais no UV. A **Figura 25** apresenta a estrutura do esqueleto de FLAV1 definida a partir dos dados espectrais até o momento.

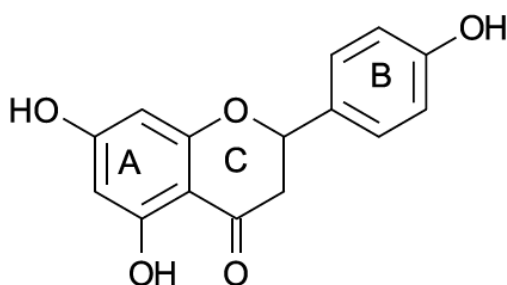


Figura 25 Esqueleto básico de FLAV1

A análise do espectro de RMN de ^1H obtido para FLAV1 indicou, ainda, que os únicos hidrogênios aromáticos presentes na estrutura são aqueles do sistema AA'XX' do anel B. Ou seja, FLAV1 também apresenta substituintes nas posições C6 e C8. Adicionalmente, foram observados no espectro de RMN de ^1H multipletos entre δ 3,13 ppm e δ 3,84 ppm atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, correspondentes aos resíduos de açúcares. Por sua vez, os dupletos centrados em δ 4,75 ppm ($J = 10,0$ Hz, 1H) e δ 4,71 ppm ($J = 10,0$ Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos dos açúcares, indicando tratar-se de um diglicosídeo. Os valores de constante de acoplamento escalar desses hidrogênios anoméricos (10 Hz) possibilitaram definir a estereoquímica β para glicose e α ou β para arabinose (Xie et al. 2003).

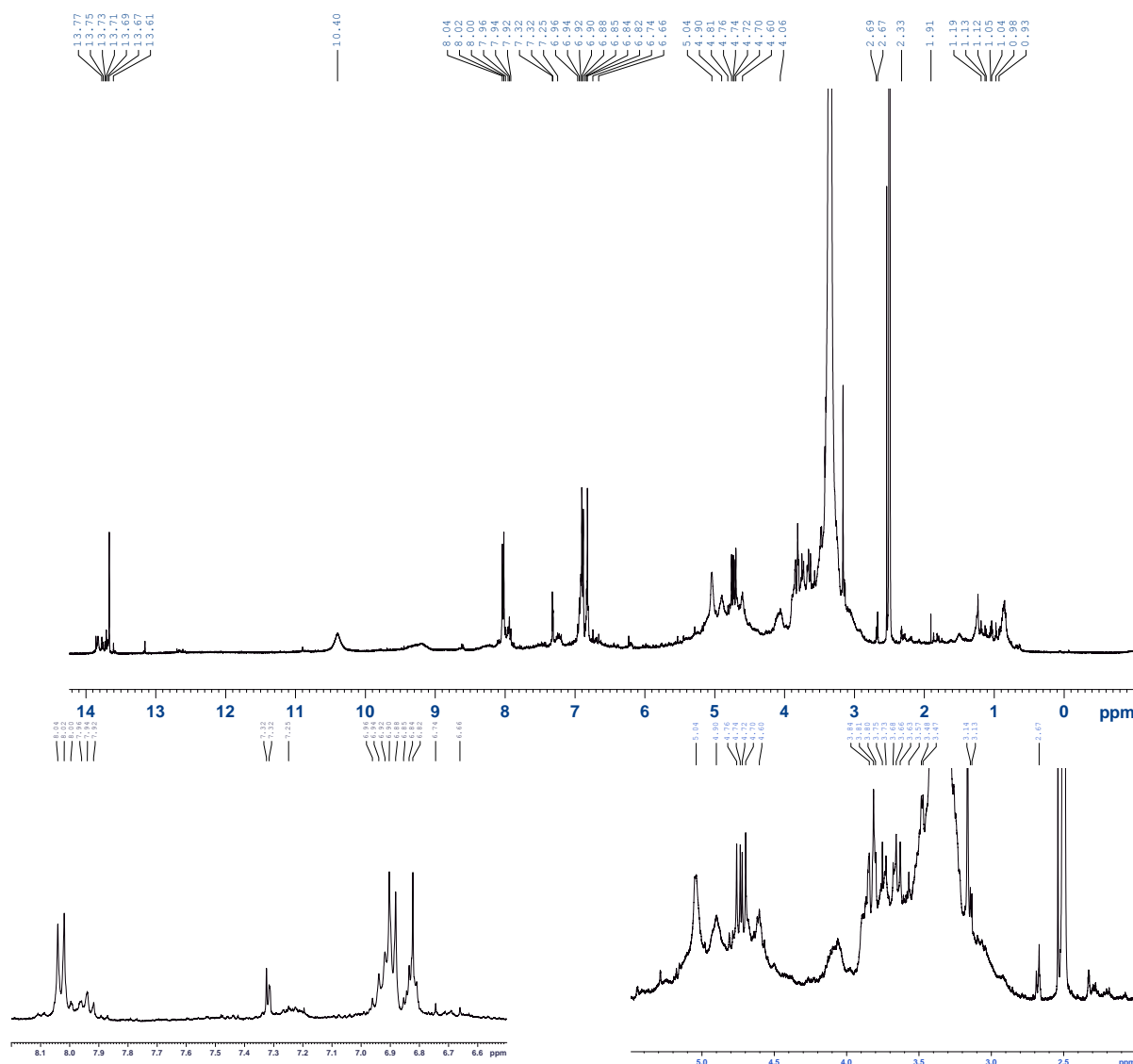


Figura 26 Espectro RMN de ^1H de FLAV1 contendo as expansões entre δ 4,0 ppm e δ 8,0 ppm (400 MHz, DMSO-d_6 , δ)

Não foi possível obter espectro de RMN de ^{13}C para FLAV1, assim, os valores de deslocamento químico dos carbonos foram obtidos a partir do mapa de contorno HSQC apresentado na **Figura 27**. A análise do mapa de contornos HSQC possibilitou confirmar as atribuições dos hidrogênios e dos respectivos carbonos do sistema AA'XX'. Assim, os dupletos centrados em δ 8,03 ppm (H2' e H6') e δ 6,89 ppm (H3' e H5') apresentaram manchas de correlação com os sinais de carbono em δ 129 ppm (C2') e δ 116,5 ppm (C3') respectivamente. Observou-se mancha de correlação entre o sinal do hidrogênio olefínico em δ 6,82 ppm e o sinal de carbono

em δ 103,0 ppm, confirmando a atribuição de C3. Os sinais correspondentes aos hidrogênios anoméricos em δ 4,74 e 4,71 ppm encontram-se sobrepostos no mapa de contornos HSQC, correlacionados a carbonos com sinais aproximados em δ 74 ppm, cujos deslocamentos químicos estão em concordância com a literatura para carbonos C-glicosilados (KRAFCHYK et al., 2008; HOOPER et al., 2010; XIE et al., 2003; BONDANCIA, 2009). No mapa de contornos observam-se 10 sinais com valores de deslocamento químico de ^{13}C entre δ 55 e 85 ppm. Considerando que os sinais dos hidrogênios anoméricos estão sobrepostos, o número de sinais de carbono é compatível com a presença de duas unidades de açúcar, sendo uma glicose (6 carbonos) e uma arabinose (5 carbonos). As correlações entre ^1H - ^{13}C , observadas no mapa de contornos HSQC de FLAV1, bem como valores encontrados na literatura, estão sumariadas nas **Tabelas 9 e 10**. Não foi possível obter mapa de contornos HMBC, o qual evidencia correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C de longa distância e, portanto, possibilitaria definir a posição de cada unidade de açúcar em C6 ou C8. Desta forma, os dados espectrais ora disponíveis para FLAV1 são compatíveis com quatro isômeros de posição: 6-C- β -D-glicosil-8-C- α -L-arabinosilapigenina (escafósídeo); 6-C- α -L-arabiosil-8-C- β -D-glicosilapigenina (isoescafósídeo); 6-C- β -D-glicosil-8-C- β -L-arabinosilapigenina (neoescafósídeo) e 6-C- β -L-arabiosil-8-C- β -D-glicosilapigenina (neoisoescafósídeo), cujas estruturas estão representadas na **Figura 30**.

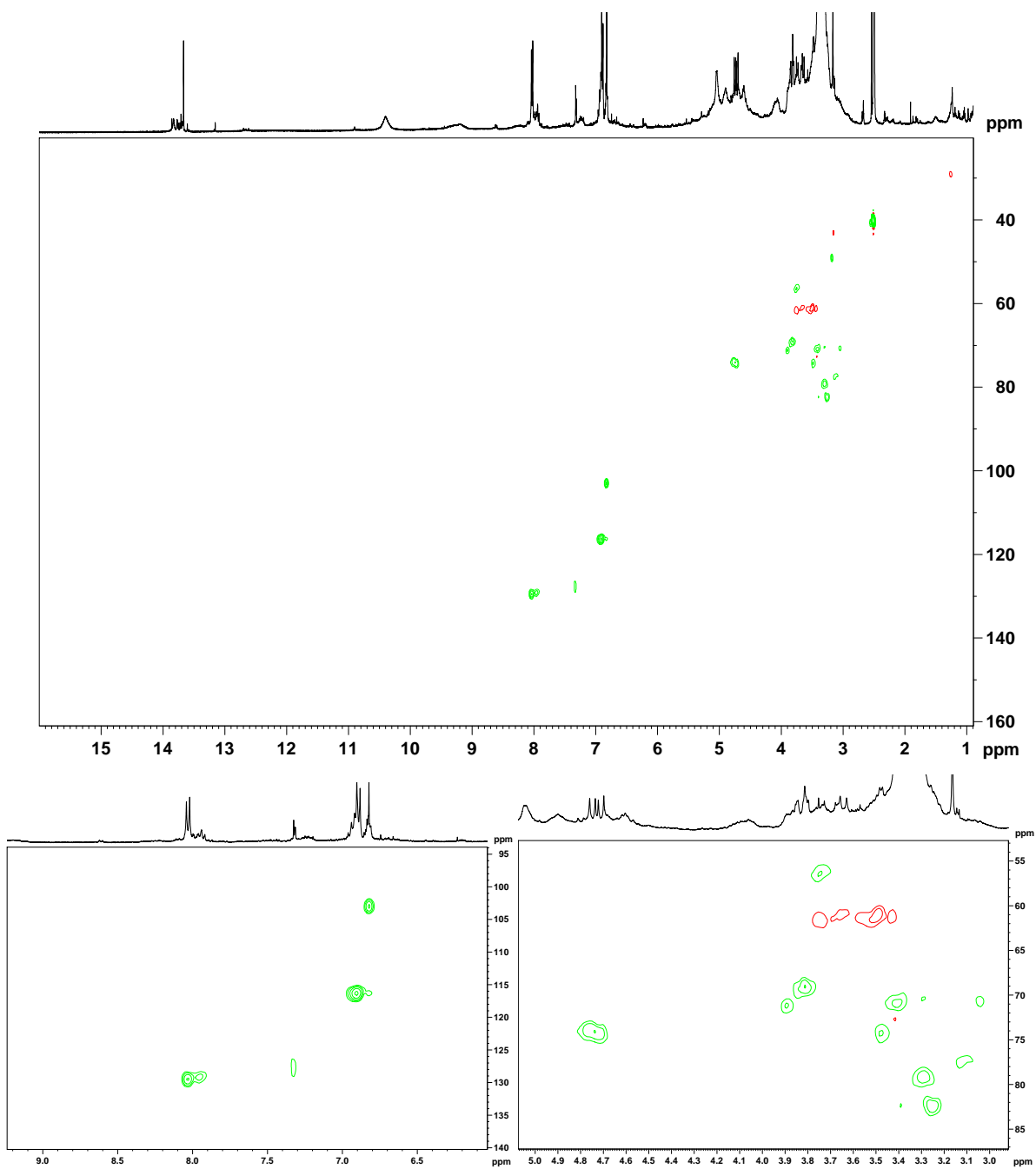


Figura 27 Mapa de contornos HSQC de FLAV1 e seções expandidas

O espectro COSY confirmou o padrão de substituição do anel B, demonstrando a correlação entre os hidrogênios do referido anel (**Figura 28**).

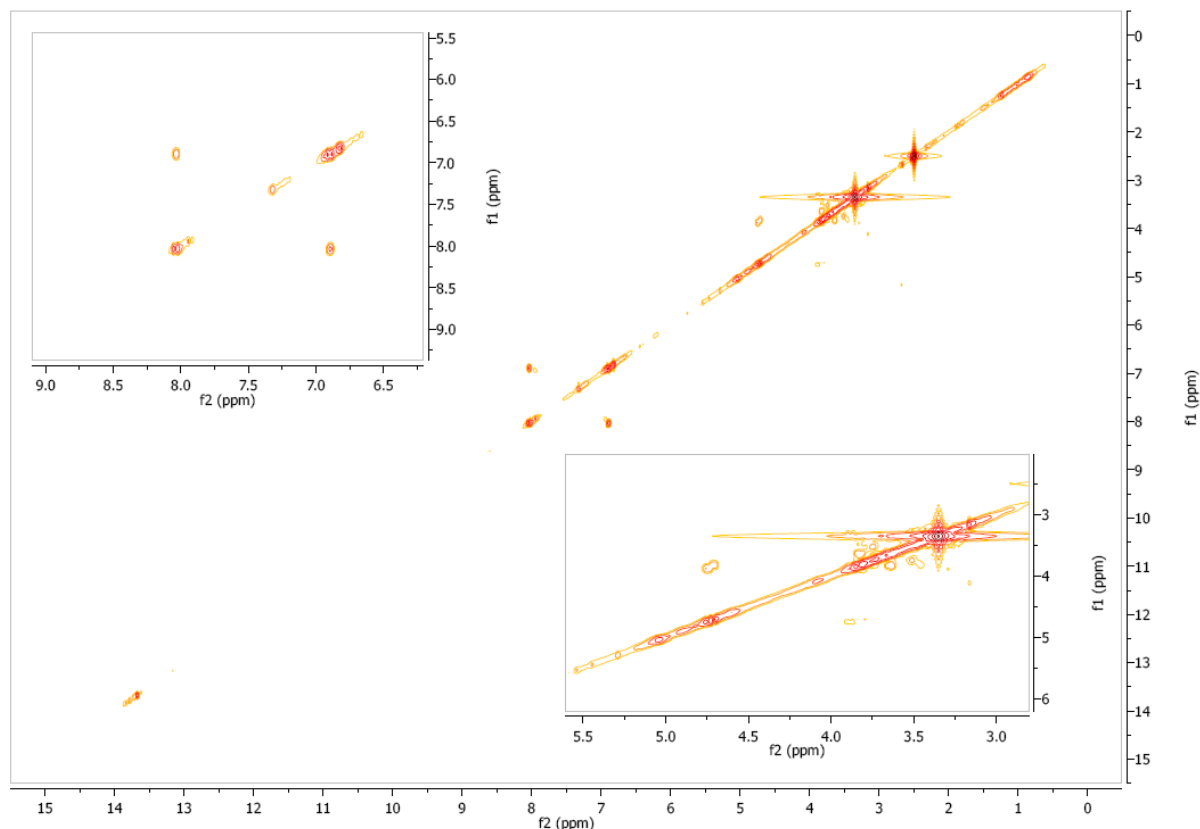


Figura 28 Experimento bidimensional COSY de FLAV1 (500 MHz, DMSO- d_6).

O espectro obtido por espectrometria de massas de ionização por elétron spray (EMIE) de FLAV1 (**Figura 29**) forneceu um pico em m/z 565,4 atribuído ao íon molecular $[M + H]^+$. Portanto, a massa molar de FLAV1 corresponde a 564 u.m.a ($C_{26}H_{28}O_{14}$). O espectro de massas obtido para FLAV1 não apresenta fragmentos característicos da perda de açúcares como nos flavonoides O-substituídos. A ausência de picos referentes à saída de glicose e arabinose, somado às observações anteriores de que FLAV1 é substituído em todas as posições do anel A, confirma que FLAV1 é um C-glicosídeo substituído nas posições C6 e C8. O espectro de massas de FLAV1 apresenta picos correspondentes às saídas consecutivas de água (m/z 547,0, 529,01 e 511,0), característicos de flavonóides C-glicosilados (TSIMOGIANNIS et al., 2007). O pico m/z 475 representa o fragmento $[M+H-90]$, característico da quebra da molécula de pentose (LIN, CHEN & HARNLY,

2008). A fragmentação de um dos isômeros propostos para FLAV1 é apresentada na **Figura 31**.

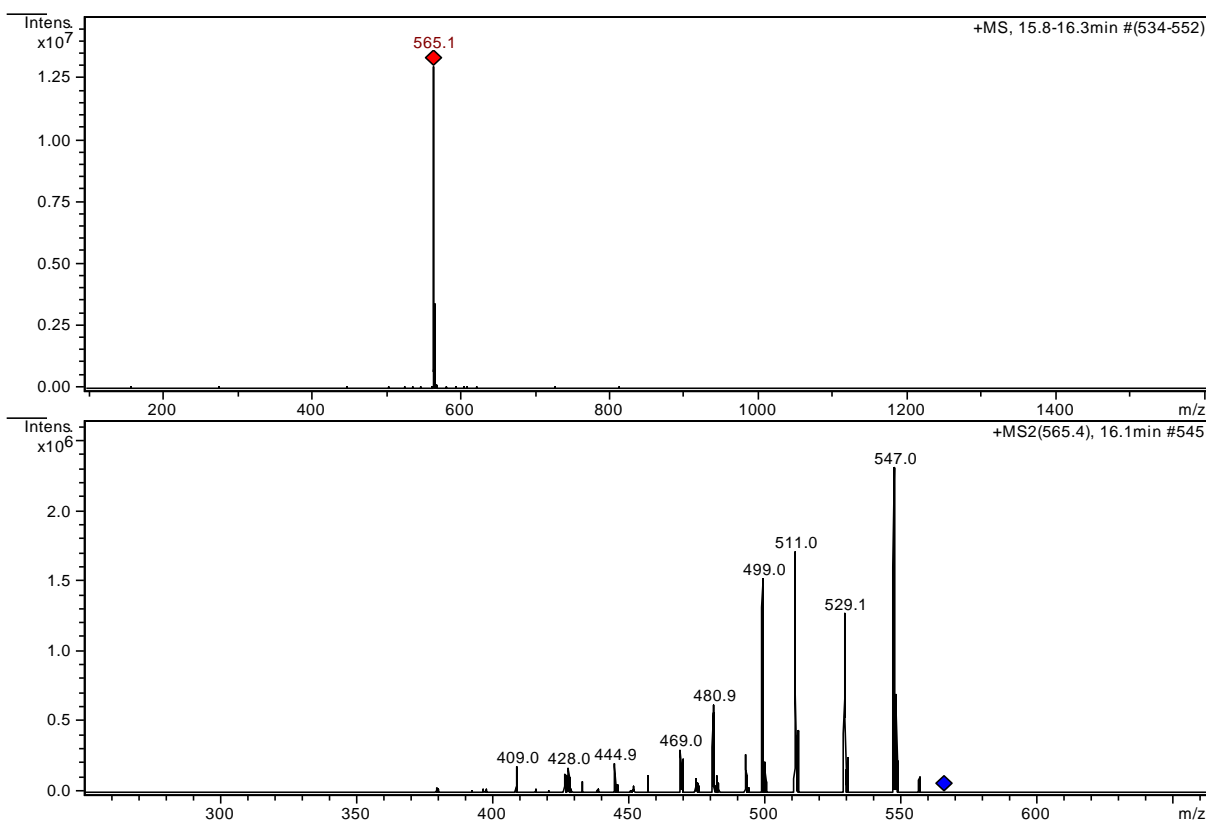


Figura 29 Espectro de massas obtido por EMIE para FLAV1.

Os espectros de massas obtidos no modo positivo para 6-C- β -D-glicosil-8-C- α -L-arabinosilapigenina (escafosídeo), 6-C- α -L-arabinosil-8-C- β -D-glicosilapigenina (isoescafosídeo) e 6-C- β -D-glicosil-8-C- β -L-arabinosilapigenina (neoescafosídeo) foram descritos por Kite et al. (2006). O espectro do escafosídeo apresentou como pico base m/z 547, enquanto que o pico base do isoescafosídeo foi m/z 427. Comparando-se o espectro de massas obtido para FLAV1 (**Figura 29**) e os obtidos por Kite et al. (2006) para o escafosídeo e isoescafosídeo, observamos que o pico base obtido para FLAV1 (m/z 547) é o mesmo que Kite et al. (2006) encontraram para escafosídeo. Além disso, o pico m/z 427 foi observado com baixas intensidades relativas, tanto para FLAV1 quanto para o escafosídeo analisado por Kite et al. (2006). Ainda de acordo com Kite et al. (2006), não foi possível distinguir os espectros de neoescafosídeo e escafosídeo.

Considerando a similaridade dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e de massas descrita na literatura científica para os quatro isômeros, além de divergências quanto aos

deslocamentos químicos e constante de acoplamento dos hidrogênicos anoméricos dos dois açúcares, não foi possível definir qual dos isômeros corresponde a FLAV1.

Experimentos de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância e dicroísmo circular devem ser realizados para confirmar a configuração e posição de ligação dos açúcares em C6 e C8. A **Figura 30** apresenta as estruturas dos quatro isômeros possíveis para FLAV1.

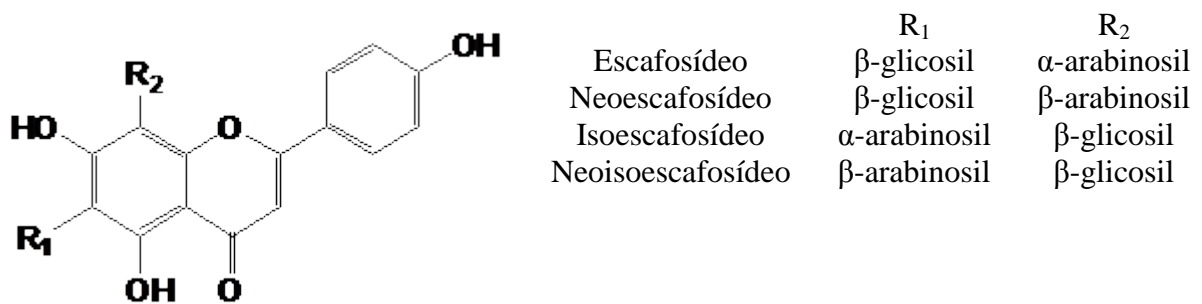


Figura 30 Estruturas compatíveis com os dados espectrais obtidos para FLAV1

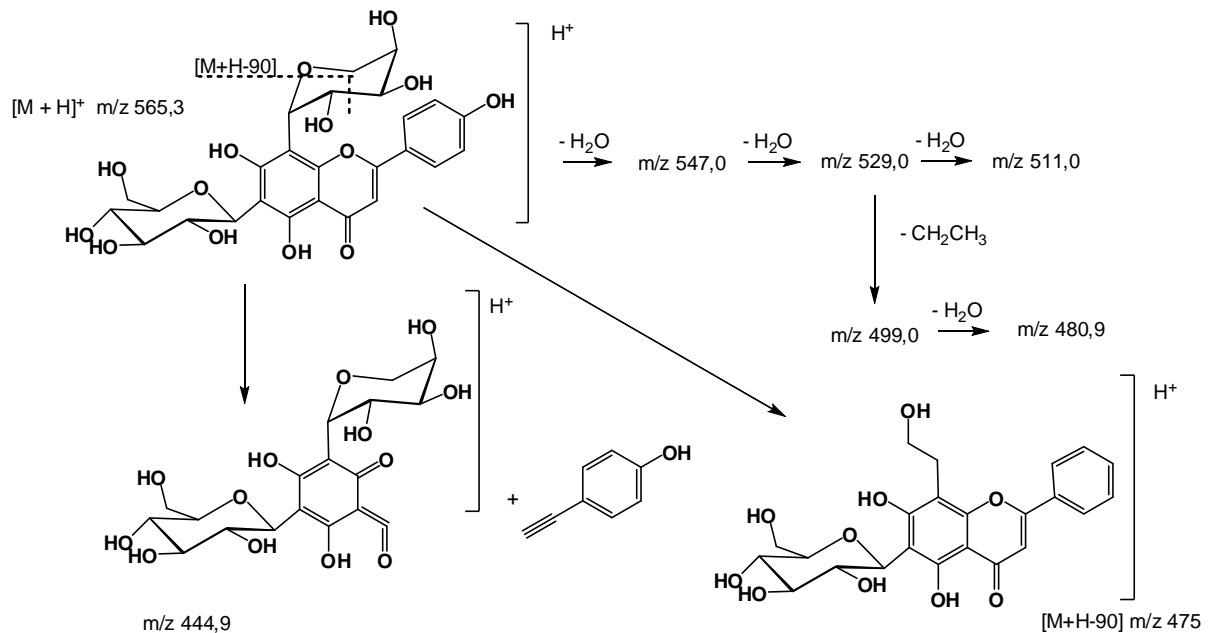


Figura 31 Mecanismo de fragmentação proposto para um dos possíveis isômeros (neoescafósídeo) de FLAV1

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no mapa de contornos HSQC obtido para FLAV1 e dados relatados na literatura para escafosídeo e neoescafosídeo (500 MHz, DMSO- d_6).

C/H	FLAV1 ^{13}C	^{13}C (δ ppm)**		FLAV1 ^1H (δ	^1H (δ ppm)**	
	(δ ppm)	Escafosídeo	Neoescafosídeo	ppm)	Escafosídeo	Neoescafosídeo
3	103,0*	101,9	101,9	6,82	6,73	6,77
5-OH				13,67	13,75	13,58
7-OH				7,32		
2'	129,0*	128,6	128,0	8,03 (d, $J_{10,0}$ Hz)	8,07 (d, $J_{8,2}$ Hz)	7,97 (d, $J_{8,8}$ Hz)
3'	116,5*	115,6	115,5	6,89 (d, $J_{10,0}$ Hz)	6,92 (d, $J_{8,2}$ Hz)	6,90 (d, $J_{8,8}$ Hz)
4'-OH				10,40		
5'	116,5*	115,6	115,5	6,89 (d, $J_{10,0}$ Hz)	6,92 (d, $J_{8,2}$ Hz)	6,90 (d, $J_{8,8}$ Hz)
6'	129,0*	128,6	128,0	8,03 (d, $J_{10,0}$ Hz)	8,07 (d, $J_{8,2}$ Hz)	7,97 (d, $J_{8,8}$ Hz)
Gli 1''	74,0*	73,1	72,8	4,74 (d, $J_{10,0}$ Hz)	4,74 (d, $J_{9,8}$ Hz)	4,61 (d, $J_{9,8}$ Hz)
2''	71,0*	70,7	69,7	3,41*	3,89	4,12
3''	80,0*	78,2	78,7	3,27*	3,28	3,20
4''	71,0*	69,7	70,5	3,82*	3,28	3,11
5''	79,0*	80,8	81,2	3,25*	3,28	3,15
6''	62,0*	60,5	61,3	3,50 e 3,52*	3,70 e 3,54	3,68 e 3,40
Ara 1'''	74,0*	74,6	71,0	4,71 (d, $J_{10,0}$ Hz)	4,80 (d, $J_{9,5}$ Hz)	5,51
2'''	69,0*	68,7	72,1	3,81*	4,09	3,78
3'''	74,0*	74,0	69,6	3,50*	3,53	3,88
4'''	71,0*	68,3	62,8	3,41*	3,88	4,01
5'''	62,0*	70,2	66,7	3,65 e 3,74*	3,93 e 3,69	3,74 e 3,64

* Dados aproximados retirados do mapa de correlação heteronuclear HSQC. Gli: β -D-glicose; Ara: β -L-arabinose

** RMN ^1H e RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 60 °C) (XIE ET AL., 2003)

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no mapa de contornos HSQC obtido para FLAV1 e dados relatados na literatura para isoescafosídeo e neoisoescafosídeo (500 MHz, DMSO-d_6).

C/H	FLAV1 ^{13}C	^{13}C (δ ppm)**		FLAV1 ^1H	^1H (δ ppm)**	
	(δ ppm)*	isoescafosídeo	neoisoescafosídeo	(δ ppm)	isoescafosídeo	neoisoescafosídeo
3	103,0*	102,0	103,16	6,82	6,66	6,77
5-OH			161,71	13,67	13,64	
7-OH			158,26	7,32		
2'	129,0*	128,7	129,10	8,03 (d, $J_{10,0}$ Hz)	7,97 (d, $J_{8,4}$ Hz)	7,92 (d, $J_{7,6}$ Hz)
3'	116,5*	115,7	116,39	6,89 (d, $J_{10,0}$ Hz)	6,89 (d, $J_{8,7}$ Hz)	6,92 (d, $J_{7,8}$ Hz)
4'-OH			161,83	10,40		
5'	116,5*	115,7	116,39	6,89 (d, $J_{10,0}$ Hz)	6,89 (d, $J_{8,7}$ Hz)	6,92 (d, $J_{7,8}$ Hz)
6'	129,0*	128,7	129,10	8,03 (d, $J_{10,0}$ Hz)	7,97 (d, $J_{8,4}$ Hz)	7,92 (d, $J_{7,6}$ Hz)
Gli 1''	74,0*	73,8	73,95	4,74 (d, $J_{10,0}$ Hz)	4,81 (d, $J_{9,9}$ Hz)	4,75 (d, $J_{9,3}$ Hz)
2''	71,0*	71,0	75,70	3,41*	3,89	3,15 a 4,00
3''	80,0*	78,8	79,31	3,27*	3,30	
4''	71,0*	70,4	69,34	3,82*	3,36	
5''	79,0*	81,5	82,33	3,25*	3,27	
6''	62,0*	61,0	59,85	3,50 e 3,52*	3,74 e 3,52	
Ara 1'''	74,0*	74,1	74,38	4,71 (d, $J_{10,0}$ Hz)	4,62 (d, $J_{9,4}$ Hz)	4,71 (d, $J_{9,6}$ Hz)
2'''	69,0*	69,0	71,50	3,81*	4,00	3,15 a 4,00
3'''	74,0*	74,0	73,91	3,50*	3,42	
4'''	71,0*	68,5	69,60	3,41*	3,77	
5'''	62,0*	69,7	71,03	3,65 e 3,74*	3,79 e 3,57	

* Dados aproximados retirados do mapa de correlação heteronuclear HSQC. Gli: β -D-glicose; Ara: β -L-arabinose

** RMN ^1H e RMN ^{13}C (DMSO-d_6 , 37 °C) (XIE ET AL., 2003)

***(KRAFCZYK et al., 2008)

Neoescafosídeo e neoisoescafosídeo já foram identificados em outras espécies vegetais (XIE et al., 2003; ANDERSEN & MARKHAM, 2006), no entanto, a ocorrência destes isômeros em *C. spiralis* é inédita. Também não foram encontrados relatos de suas ocorrências na família Costaceae.

O neoescafósídeo e neoisoescafósídeo apresentam algumas características estruturais que, de acordo com Gautam et al. (2009), são essenciais para que o flavonoide apresente atividade anti-inflamatória, a saber: ligação dupla entre C2 e C3; presença de sistema de anel planar e hidroxilas nas posições C5, C7 e C4'.

Não foram encontrados na literatura científica estudos que avaliassem o potencial anti-inflamatório do neoescafósídeo ou do neoisoescafósídeo. No entanto, há vários trabalhos onde seus isômeros, escafósídeo e isoescafósídeo, foram avaliados.

De acordo com Gautam et al. (2009), a introdução de molécula de açúcar no esqueleto básico do flavonoide reduz a atividade anti-inflamatória. Por outro lado, em um trabalho de síntese orgânica regiosseletiva de C-diglicosilflavonas, Shie et al. (2010) observaram que a introdução de glicose no esqueleto da apigenina aumentou a atividade anti-inflamatória do derivado em relação à aglicona. No trabalho de SHIE et al. (2010), 6-C- β -glicosil-8-C- α -arabinosilapigenina (escafósídeo) inibiu a expressão de TNF α e reduziu a produção de NO com CI_{50} de $27,0 \pm 2,1$ e $9,9 \pm 1,6$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, demonstrando que a flavona atua nos mediadores da segunda fase do processo inflamatório.

O isômero escafósídeo também foi isolado de *Eleusine indica* Gaertn (Poaceae), planta cujas partes aéreas são utilizadas, no Brasil, para o tratamento de processos inflamatórios. O escafósídeo foi avaliado quanto à capacidade de inibir o recrutamento de neutrófilos no pulmão de camundongos expostos a aerossóis contendo bactérias Gram-positivas. Na dose de 400 $\mu\text{g/Kg}$, o escafósídeo inibiu em 62% o influxo de neutrófilos, sendo considerado como uma das substâncias responsáveis pela atividade da espécie (MELO et al., 2005). Em outro trabalho, o escafósídeo demonstrou efeito preventivo contra produção de pedra nos rins em ratos, avaliado através da produção de urina, excreção de Ca, ácido cítrico e análise de creatinina (KUBO et al., 1989). Os isômeros escafósídeo e isoescafósídeo foram isolados de *Vitex poligama* Cham (Lamiaceae), planta utilizada popularmente no Brasil contra doenças dos rins (GALLO et al., 2008).

5.5 Validação de método para quantificação de flavonoides totais em derivados da droga vegetal folhas de *Costus spiralis*

Devido a presença de flavonoides em EECS e na fração EtOAc:MeOH (1:1), bem como a atividade antiedematogênica de ambos, procedeu-se à quantificação de flavonoides totais visando investigar a relação entre esses metabólitos secundários e a atividade biológica. A metodologia analítica utilizada, espectrometria no ultravioleta visível, foi validada segundo a RE 899 (Brasil, 2003).

A quantificação de flavonoides totais de EECS foi realizada por espectrofotometria no visível, em 420 nm, após reação com $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. O método baseia-se na propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com os flavonoides em metanol. Os complexos formados apresentam absorção mais intensa e em maior comprimento de onda que os flavonoides não complexados. Desta forma, torna-se possível a quantificação dos flavonoides sem a intervenção de outras substâncias fenólicas que comumente estão presentes nos tecidos vegetais. Alguns ácidos fenólicos também formam complexos com cloreto de alumínio; porém, os complexos de ácidos fenólicos absorvem em comprimentos de onda próximos a 350 nm (ZAPOROZHETS et al., 2003), não interferindo nas medidas de absorbância em 420 nm.

Conforme a RE nº 899 (BRASIL, 2003), testes quantitativos para determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias primas são classificados como pertencentes à categoria I. Ainda de acordo com a resolução, os testes necessários para validação de metodologias da categoria I são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Assim, estas foram as figuras de mérito utilizadas na validação do método aplicado à quantificação de flavonoides totais no extrato de *C. spiralis*. Além destas, determinou-se também limite de quantificação e limite de detecção. A validação do método foi realizada com um extrato comercial de *C. spiralis*, obtido da empresa Indústria Farmacêutica Catedral LTDA, denominado EICS. Este extrato foi empregado devido à disponibilidade de massa. O extrato comercial apresentou perfis cromatográficos por CLAE-DAD e CCD de sílica gel

similares ao extrato de *C. spiralis* preparado no presente trabalho e utilizado nos fracionamentos.

5.5.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos no EICS, foram obtidos espectros da solução preparada para a leitura em 420 nm com e sem a adição de solução metanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 12 % m/v. Os espectros registrados para as duas soluções estão representados na **Figura 32**. Observa-se uma absorção pequena (0,050) para a solução de EICS sem adição de AlCl_3 em 420 nm. Por outro lado, a solução em que foi adicionada o AlCl_3 apresentou uma banda intensa com máximo de absorção (0,463) em λ 420 nm e. Deste modo, não há comprometimento da quantificação por substâncias presentes no EICS. Ainda assim, para evitar essa pequena interferência de substâncias presentes no extrato, utilizou-se (conforme descrito no método, item 4.11.1) a solução do extrato como branco.

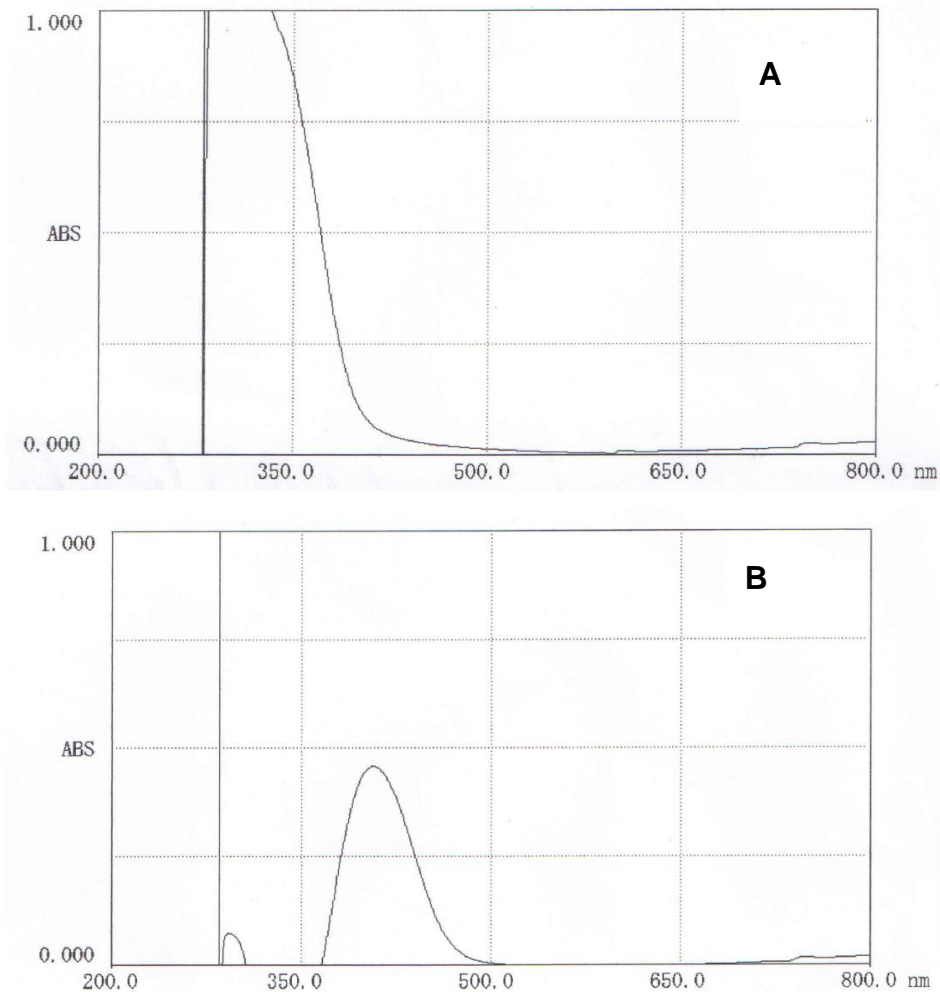


Figura 32 Espectros de varredura no UV obtidos para solução hidrometanólica de EICS sem adição de solução de cloreto de alumínio (A) e com adição de solução de cloreto de alumínio (B).

5.5.2 Linearidade

Para verificação da linearidade do método, foram construídas três curvas analíticas, obtidas em diferentes dias, relacionando absorvância e concentração das soluções de quercetina, em uma faixa de 0,0115 a 0,0173 mg/mL, o que corresponde de 80 a 120% da concentração de leitura (0,0144 mg/mL) de quercetina. Os resultados foram submetidos a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As equações obtidas para cada curva e os respectivos coeficientes de determinação também se encontram na **Tabela 11**. As curvas obtidas foram comparadas estatisticamente por análise de variância ($p < 0,05$) e se mostraram estatisticamente equivalentes. A equação da curva média também é demonstrada

na **Tabela 11**. Para análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (2007). A **Figura 33** apresenta as curvas analíticas obtidas, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2), ambos obtidos a partir da média das três curvas.

Tabela 11 - Concentração de soluções de quercetina e respectivas absorvâncias (λ 420 nm) utilizadas para construção das curvas analíticas.

Concentração de quercetina (mg/mL)	Absorvância em 420 nm		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,01152	0,625	0,628	0,632
0,01296	0,708	0,712	0,715
0,01440	0,785	0,788	0,792
0,01584	0,868	0,871	0,864
0,01728	0,953	0,950	0,949
Equação da reta	$y = 56,67x - 0,0282$	$y = 55,76x - 0,0132$	$y = 54,38x - 0,0074$
r^2	0,9997	0,9998	0,9993
Equação da curva média	$y = 55,6019x - 0,01133$		
r^2 da curva média	0,9996		

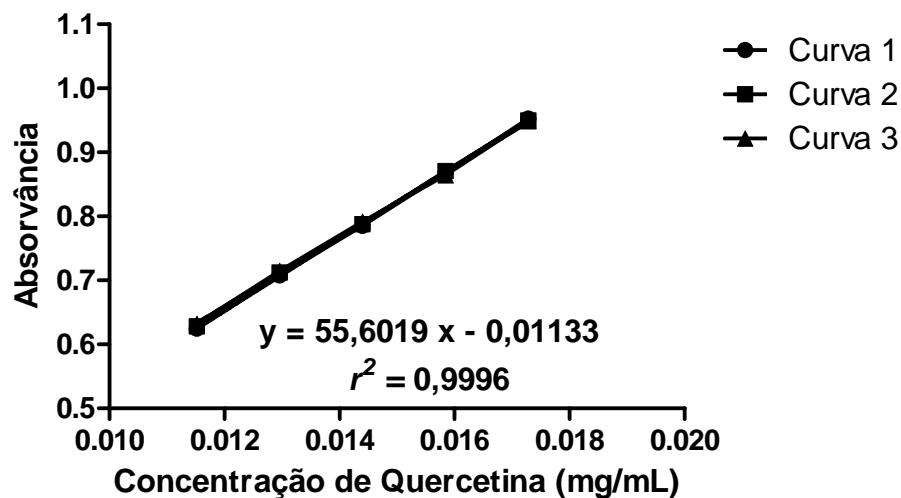


Figura 33 Curvas analíticas obtidas para a quantificação de flavonoides totais por espectrometria no UV-Vis em 420 nm, utilizando quercetina como padrão.

Como as curvas apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,99, valor estabelecido pela RE 899 (BRASIL, 2003) como limite de aceitação para determinação da linearidade da curva analítica, conclui-se que o método apresenta a linearidade satisfatória.

Segundo a RE 899, o intervalo de trabalho é estabelecido pela confirmação de que o método desenvolvido apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo concentrações de substâncias dentro do intervalo especificado. A mesma resolução determina que o intervalo seja de 80 a 120% da concentração teórica do teste na determinação quantitativa do analito (no caso, flavonoides totais calculados como quercetina). Como os resultados demonstraram que o método é linear, preciso e exato (resultados apresentados nos itens 5.4.3 e 5.4.4) nesta faixa, determinou-se que o intervalo de trabalho do método é de 0,0115 mg/mL a 0,0173 mg/mL como concentração de flavonoides totais na solução final analisada.

5.5.3 Precisão

A precisão intradia foi determinada pela análise dos teores de flavonoides totais encontrados em seis determinações realizadas no mesmo lote do EICS. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 12**, onde também estão discriminados o teor médio e o desvio padrão relativo (DPR). A resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003) determina que, para ser considerado preciso, o método deve apresentar DPR < 5,0%. Sendo o valor encontrado de 1,88 %, conclui-se que o método apresenta precisão intradia adequada.

Tabela 12 - Teores de flavonoides totais em EICS expressos em quercetina obtidos na determinação da precisão intradia para o método espectrofotométrico no UV-VIS em 420 nm.

Repetições	Massa (g)	Absorvância	Teor (%)
1	2,5005	0,557	0,089
2	2,5006	0,536	0,086
3	2,5009	0,542	0,087
4	2,5018	0,535	0,086
5	2,5010	0,548	0,088
6	2,5016	0,529	0,085
Padrão	0,0031	0,775	-
Média			0,087
DPR (%)			1,88

A determinação da precisão interdias foi avaliada a partir da análise de doze amostras do mesmo lote de EICS em dois dias diferentes, por analistas distintos ($n = 12$), como descrito no item 4.11.4. Os teores e o DPR encontrados estão descritos na **Tabela 13**. O valor de DPR obtido para a precisão interdias também foi inferior ao limite de aceitação da ANVISA (BRASIL, 2003), indicando que o método apresenta precisão interdias adequada. O teste t de Student foi utilizado para verificar se a média dos teores do primeiro dia diferia significativamente da média dos teores do segundo dia, não se observando diferença entre as médias ($p < 0,05$).

Tabela 13 Teores de flavonoides totais em EICS expressos em quercetina obtidos na determinação de precisão interdias para o método espectrofotométrico no UV-VIS em 420 nm.

Dia / Analista	Amostra	Teor (%)
1	1	0,089
	2	0,086
	3	0,087
	4	0,086
	5	0,088
	6	0,085
2	1	0,082
	2	0,083
	3	0,084
	4	0,095
	5	0,089
	6	0,096
Teor médio (%)		0,088
DPR (%)		4,96%

5.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela adição de quantidades conhecidas da substância de referência (quercetina) às amostras de EICS, a fim de obter três níveis de concentração dentro da faixa de linearidade estabelecida, ou seja, concentração baixa (80% da concentração do teste), concentração média (100% da concentração do teste) e concentração alta (120% da concentração do teste). A partir desta adição as amostras foram tratadas como descrito no método (item 4.11.1) e foram realizados os cálculos de concentração teórica, concentração experimental e exatidão em cada nível, estimada como percentual de recuperação. O objetivo dessa figura de mérito é verificar se o método é capaz de recuperar o analito (no caso flavonoides totais) dentro dos limites estabelecidos.

A resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003) não determina limites para a exatidão. Assim, foram utilizados os critérios de aceitação para recuperação determinados no manual de validação da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Esse manual de validação estabelece limites de recuperação diferentes para concentrações diferentes de analito na amostra. Como a concentração de flavonoides totais em EICS foi de 0,088%, utilizou-se como critério de aceitação de recuperação a faixa de 90,0 a 108,0%, definida no manual para concentrações de analito de 0,1% (AOAC, 2002).

Na **Tabela 14** observa-se que os valores médios de recuperação obtidos para os três níveis de fortificação (80, 100 e 120 %, para os níveis baixo, médio e alto, respectivamente) atendem ao critério definido pela AOAC, donde se conclui que o método é exato.

Tabela 14 – Resultados obtidos no teste de exatidão para determinação de flavonoides totais em EICS.

	Níveis de Concentração									Padrão
	1 (80%)			2 (100%)			3 (120%)			
	Amostras			Amostras			Amostras			
	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	3c	
Massa da amostra (g)	1,2504	1,2508	1,2504	1,2509	1,2500	1,2501	1,2506	1,2503	1,2504	-
Massa de padrão adicionado (mg)	1,33	1,32	1,29	1,92	1,89	1,90	2,50	2,53	2,49	3,20
Concentração teórica na solução de leitura (mg/mL)	0,01167	0,01162	0,01147	0,01450	0,01435	0,01440	0,01728	0,01743	0,01723	-
Absorvância	0,613	0,636	0,624	0,758	0,749	0,740	0,897	0,912	0,918	0,790
Concentração experimental na solução de leitura (mg/mL)	0,01192	0,01237	0,01213	0,01474	0,01456	0,01439	0,01744	0,01773	0,01785	0,01536
Recuperação (%)	102,17	106,42	105,74	101,64	101,47	99,91	100,91	101,76	103,57	-
Média da recuperação (%)	104,78			101,01			102,08			-
DPR (%)	2,18			0,94			1,33			-

5.5.5 Robustez

Pequenas variações no método analítico foram realizadas para verificar se o método seria capaz de resistir às mesmas, ou seja, para verificar se o método era robusto a estas variações. As variações realizadas foram no tempo de leitura após a adição do reagente de complexação (25, 30 e 35 minutos), no comprimento de onda de leitura (418, 420 e 422 nm) e na concentração do reagente de complexação (soluções metanólicas de cloreto de alumínio a 10, 12 e 14 % m/v). As médias dos teores de flavonoides totais, calculados como quercetina, foram tratadas estatisticamente pelo método ANOVA seguida do teste de Tukey. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 no tratamento dos dados. A **Figura 34** apresenta o gráfico com os teores de flavonoides totais, expressos em quercetina, após as variações realizadas na metodologia. Não foi observada diferença entre os teores de flavonoides totais, após a análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Estes resultados atestam que o método é robusto para as variações testadas.

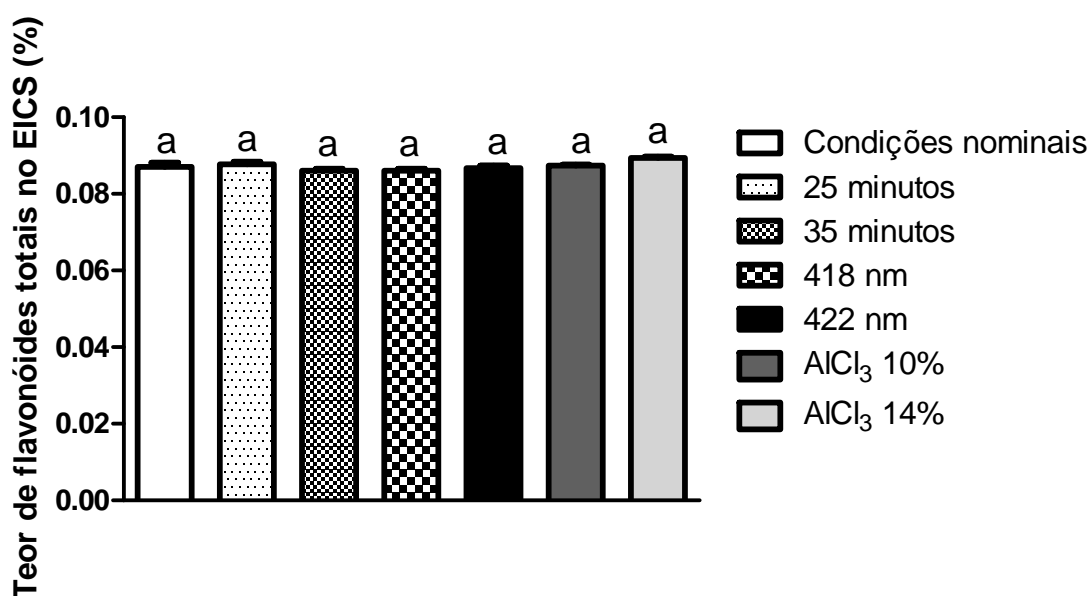


Figura 34 Comparação entre os teores de flavonoides totais calculados como quercetina para EICS analisado nas condições nominais do método e em variações deliberadas do tempo de leitura, comprimento de onda e concentração da solução do reagente de complexação (média n=3). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey.

5.5.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método foi determinado pela equação descrita no item 4.11.7, que emprega os parâmetros da curva analítica. Para o cálculo foram empregados o desvio padrão do intercepto com o eixo y e a inclinação da curva analítica. O limite de quantificação calculado foi de 0,00746 mg/mL.

5.5.7 Limite de detecção

O limite de detecção do método foi determinado pela equação descrita no item 4.11.8, que emprega os parâmetros da curva analítica. Para o cálculo foram empregados o desvio padrão do intercepto com o eixo y e a inclinação da curva analítica. O limite de quantificação calculado foi de 0,00246 mg/mL.

5.5.8 Quantificação de flavonoides totais em EECS e na fração EtOAc:MeOH (1:1)

Considerando que o método de quantificação proposto foi validado obtendo-se linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequados, procedeu-se à quantificação de flavonoides totais calculados como quercetina em EECS e na fração EtOAc:MeOH (1:1). A tomada de amostra foi definida a partir do rendimento obtido para a fração e pelo percentual de extrativo determinado para EICS. A tomada de amostra também levou em conta a faixa de concentração definida para o método.

As amostras foram analisadas em triplicata e a **Tabela 15** apresenta os teores de flavonoides totais calculados.

Tabela 15 – Teores de flavonoides totais expressos como quercetina para EECS e para a fração EtOAc:MeOH (1:1)

Material analisado	Análise	Teores (%m/m)	Média	DPR (%)
EECS	1	0,788	0,795	0,75
	2	0,799		
	3	0,798		
Fração EtOAc:MeOH	1	0,918	0,918	0,56
	2	0,923		
	3	0,913		

5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória de EECS, frações e FLAV1

No presente trabalho, EECS, as frações derivadas deste e a substância isolada FLAV1 tiveram sua potencial atividade anti-inflamatória avaliada em modelo de edema de pata de camundongos induzido por carragenina.

EECS apresentou atividade anti-inflamatória na quinta hora após administração do estímulo inflamatório, nas doses de 100 e de 1000 mg/Kg, com porcentagens de inibição do edema de 42,3% e 39,6%, respectivamente (**Figura 35**). Como os resultados iniciais indicaram uma tendência no aumento da atividade no decorrer do tempo, avaliou-se EECS em um segundo protocolo experimental por um período de 24 horas. Neste experimento observamos atividade anti-inflamatória na quinta hora após o estímulo inflamatório, nas três doses testadas (10, 100 e 1000 mg/Kg), com porcentagens de inibição de 30,4%, 21,6% e 27,2%, respectivamente. Observamos um aumento na atividade até a sétima hora que mostrou porcentagens de inibição de 44,3%, 25,2% e 36,5% para as doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg, respectivamente. A partir da sétima hora as porcentagens de inibição diminuíram, não se observando atividade antiedematogênica para EECS nove horas após o estímulo inflamatório, em nenhuma das doses ensaiadas, enquanto o efeito da dexametasona, empregada como controle positivo, foi observado até 12 horas após o estímulo.

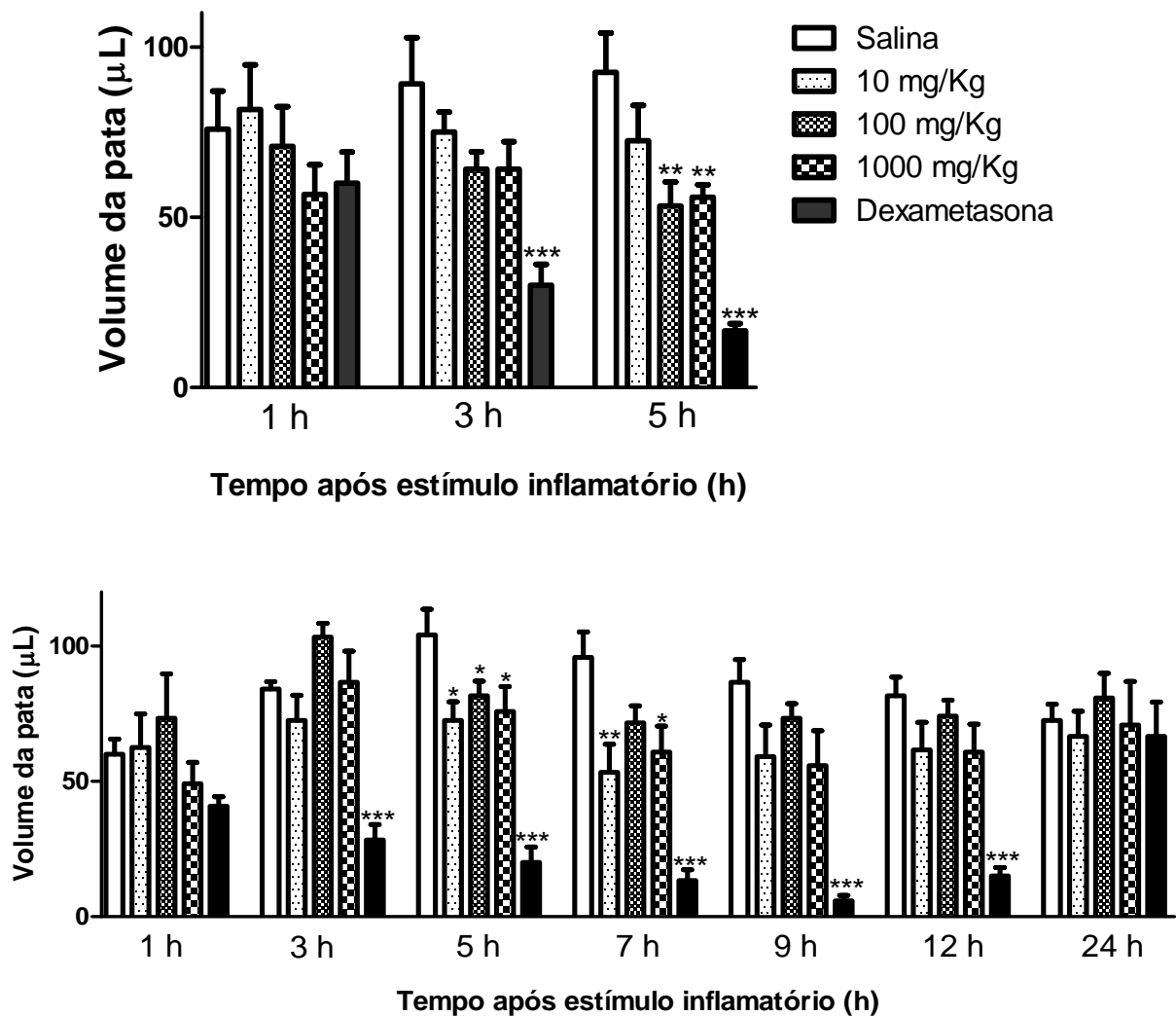


Figura 35 Efeito de EECS sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. As barras representam a variação média dos volumes das patas \pm erro padrão ($n=6$). * Indicam diferenças significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina envolve a liberação de mediadores químicos na fase inicial (histamina e serotonina) e a produção de prostaglandinas e proteases na fase tardia (CRUNKHON & MEACOCK, 1971). Ativação local de neutrófilos (BOUGHTON-SMITH et al., 1993) e produção de NO (POSADAS et al., 2004) também ocorrem na segunda fase do processo inflamatório produzido neste modelo. O fato de EECS apresentar atividade antiedematogênica significativa 5 horas após o estímulo inflamatório sugere que os constituintes de EECS são capazes de inibir a segunda fase do processo inflamatório.

EECS foi submetido a fracionamento preliminar em coluna de sílica gel (item 4.6, pág. 60) e as frações resultantes foram avaliadas no modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina (**Figuras 36, 37 e 38**). Os resultados obtidos indicam que somente as frações Hex e EtOAc:MeOH (1:1) apresentaram atividade antiedematogênica significativa em relação ao grupo controle, na quinta hora após o estímulo inflamatório, com 53,4% de inibição para a fração Hex na dose 500 mg/Kg e inibições de 39,0%, 31,2% e 41,6% para a fração EtOAc:MeOH (1:1) nas doses 5, 50 e 500 mg/Kg, respectivamente.

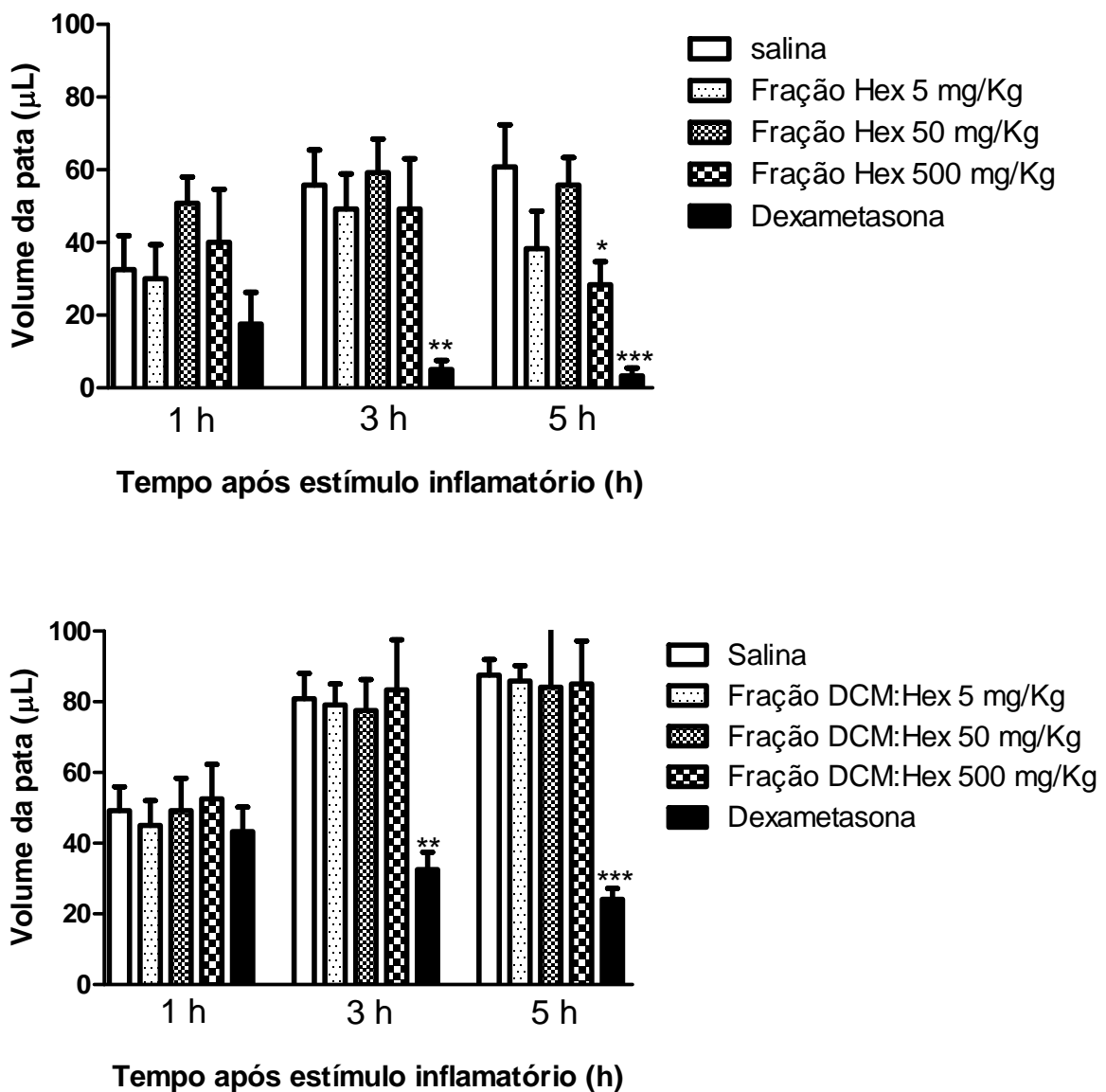


Figura 36 Efeito das frações Hex e Hex:DCM sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. As barras representam a variação média dos volumes das patas \pm erro padrão (n=6). * Indicam diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

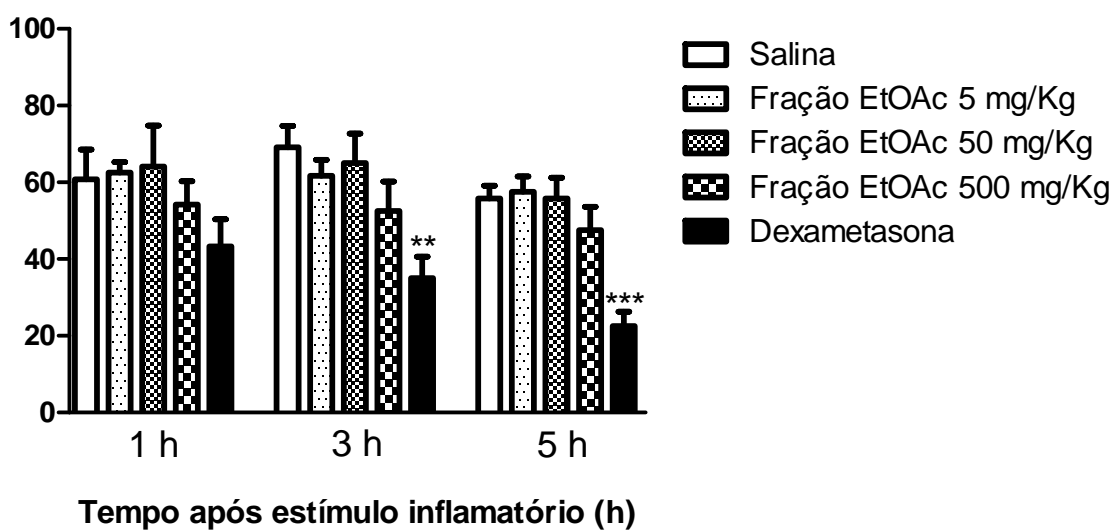
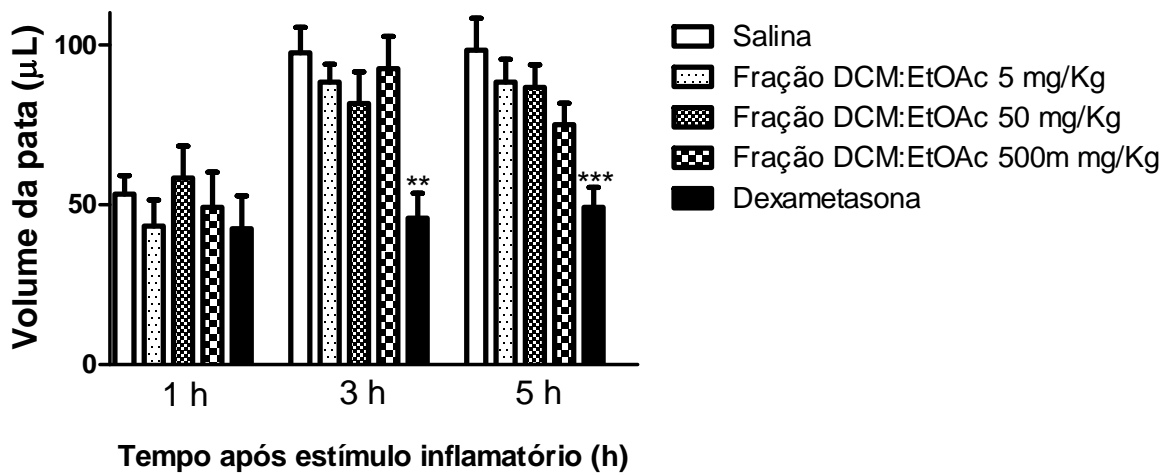
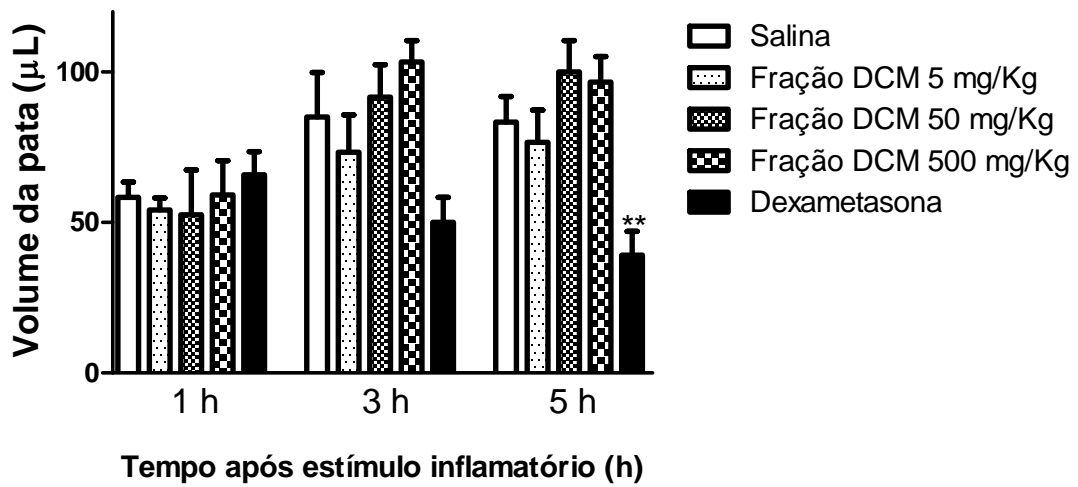


Figura 37 Efeito das frações DCM, DCM:EtOAc e EtOAc sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. As barras representam a variação média dos volumes das patas \pm erro padrão (n=6). * Indicam diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

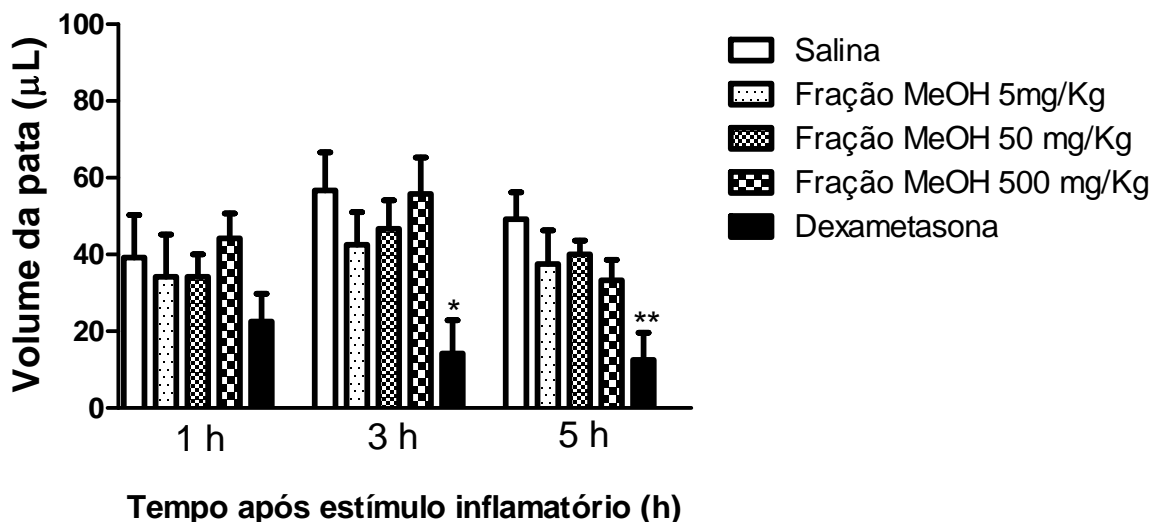
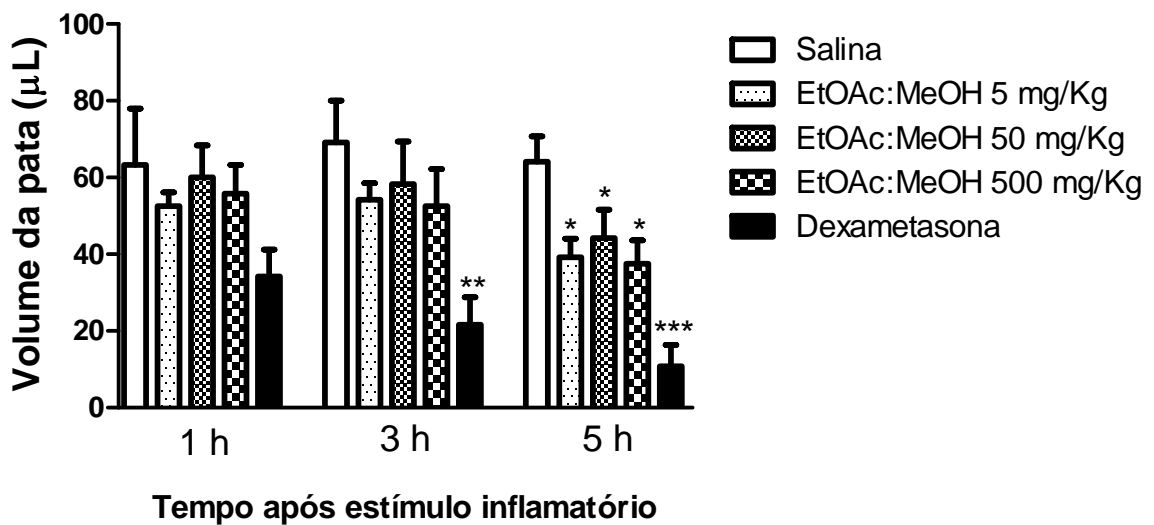


Figura 38 Efeito das frações EtOAc:MeOH e MeOH sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. As barras representam a variação média dos volumes das patas \pm erro padrão ($n=6$). * Indicam diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

A **Figura 39** apresenta os resultados de atividade anti-edematogênica obtidos para FLAV1. FLAV1 induziu uma resposta anti-inflamatória estatisticamente significativa em relação ao grupo controle a partir da terceira hora da administração do estímulo inflamatório, nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg. As porcentagens de inibição do FLAV1 foram, na quinta hora, de 32,8%, 39,7% e 44,8%, para as doses 0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg, respectivamente, sendo a porcentagem de inibição de dexametasona de 86,2% na dose utilizada (1,0 mg/Kg). Este resultado sugere uma significativa atividade anti-inflamatória para FLAV1 e abre perspectivas de estudos posteriores com este flavonoide, a fim de caracterizar sua ação farmacológica.

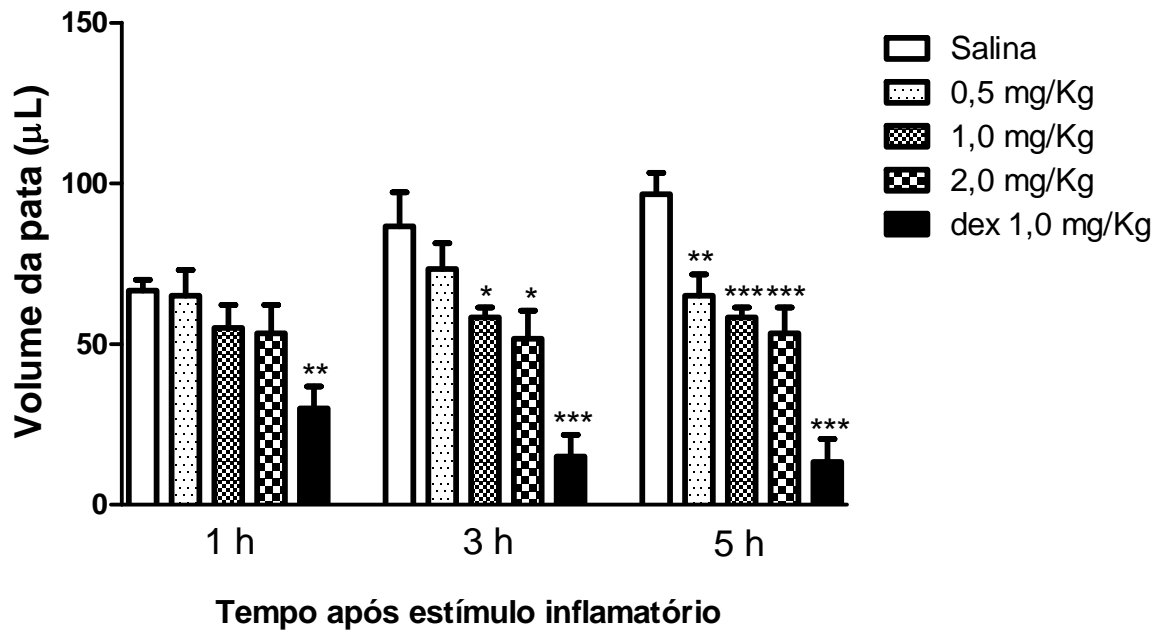


Figura 39 Efeito do FLAV1 sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. As barras representam a variação média dos volumes das patas \pm erro padrão (n=6). * Indicam diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

6 CONCLUSÕES

O extrato etanólico de folhas de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe apresentou atividade anti-inflamatória em ensaio *in vivo* de inibição de edema de pata em camundongos, confirmando o uso tradicional da espécie evidenciando a eficiência da estratégia etnofarmacológica.

O fracionamento do extrato forneceu sete frações, as quais também foram testadas quanto à capacidade antiedematogênica no modelo de edema de pata. As frações Hex e EtOAc:MeOH (1:1) apresentaram atividade antiedematogênica.

A fração EtOAc:MeOH (1:1) foi refracionada e isolou-se a substância majoritária FLAV1, uma flavona cuja estrutura, baseada nos dados espectroscópicos disponíveis, é compatível com quatro flavonas isoméricas: escafosídeo, isoescafosídeo, neoescafosídeo e neoisoescafosídeo.

FLAV1 apresentou atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata em camundongos nas doses 1,0 e 2,0 mg/Kg, indicando sua contribuição para a atividade anti-edematogênica da espécie e pode ser utilizada como marcador químico.

O método de quantificação de flavonoides totais calculados como quercetina apresentou seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequados para quantificação de extratos etanólicos de *Costus spiralis*. Desta forma, o método de quantificação dos flavonoides totais no extrato poderá ser utilizado como parâmetro de qualidade e indicativo do potencial anti-inflamatório, uma vez que os flavonoides estão relacionados com a atividade da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGA, A. O.; NJOKU, C. I.; EKEJIUBA, E. S.; ESIAKA, M. N.; ASUZU, I. U. Investigations of the methanolic leaf extract of *Costus afer* Kir for pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v.11, n.2-3, p. 242-2488, 2004.

ANDERSEN, O. M. & MARKHAM, K. R. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. United States of America: **CRC Press Taylor & Francis Group**, 2006, p. 1197.

ANTUNES, A. S.; SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from leaves of *Costus spiralis*. **Fitoterapia**, v.71, p.507-510, 2000.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. **AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**. 2002. http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf Acesso em: 17 apr 2011.

ARAUJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, n.1, p. 61-70, 2007.

BASTOS, L. F. S.; ANGUSTI, A.; VILACA, M. C.; MERLO, L. A.; NASCIMENTO, E. B.; ROCHA, L. T. S.; GODIN, A. M.; SOLANO, A. G. R.; JARUSSOPHON, S.; NUMAN, E. A.; KONISHI, Y.; COELHO, M. M. A novel non-antibacterial, non-chelating hydroxypyrazoline derivative of minocycline inhibits nociception and oedema in mice. **British Journal of Pharmacology** v.155, p. 714-721, 2008.

BAVARVA, J. H.; NARASIMHACHARYA, H. V. R. L. Antihyperglycemic and hipolipidemic effects of *Costus speciosus* in Alloxan induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.22, p.620-626, 2008.

BI, X. L.; YANG, J. Y.; DONG, Y. X.; WANG, J. M.; CUI, Y. H.; IKESHIMA, T.; ZHAO, Y.Q.; WU, C. F. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia. **International Immunopharmacology**, v.5, p.185-193, 2005.

BÖHME, F.; SCHMIDT, J.; SUNG, T. V.; ADAM, G. 24-methyl pollinastanone, related triterpenoids and sterols from *Costus tonkinensis*. **Phytochemistry**. v.45, n.5, p.1041-1044, 1997.

BONDANCIA, T. M. **Estudo fitoquímico de *Rauia* sp e atividade sobre formigas cortadeiras e sobre a largata do cartucho do milho**. 2009. 336 f. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2009.

BOUSKELA, E.; DONYO, K. A. Effects of oral administration of purified micronized flavonoid fraction on increased microvascular permeability induced by various agents

and on ischemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. **Angiology**, v.48, n.5, p.391-399, 1997.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, 02.06.03.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo – Patologia geral**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 312 p.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**; 70:93–103, 2004.

CAMARGO, M. E. M.; NAJERA, R. C.; TORRES, R. S.; ALDRETE, M. E. C. Evaluation of the diuretic effect of the aqueous extract of *Costus pictus* D. Don in rat. **Proceedings of the Western Pharmacology Society** v.49, p.72-74, 2006.

CAMPOS, V. M.; PAISN, L. A. A. P.; BARJA, P. R. Photosynthetic activity and growth analysis of the plant *Costus spicatus* cultivated under different light conditions **European Physical Journal**. Special Topics. 153, 527 – 529, 2008.

CHANG, Y.Q.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; GE, L. Surfactant – assisted pressurized liquid extraction for determination of flavonoids from *Costus speciosus* by micellar electrokinetic chromatography. **J. Sep. Sci.**, v.34, p.462 – 468, 2011.

CHAVES, D. S. A. **Estudo químico e potencial antitrombótico da espécie medicinal *Petroselinum crispum* (Apiaceae)**. 2006. 114f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHO, J. Y.; BAIK, K. U.; YOO, E. S.; YOSHIKAWA, K.; PARK, M. H. *In vitro* anti-inflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*. **Journal Natural Products**., v.63, p.1205-1209, 2000.

CHOI, B. H.; AHN, I. S.; KIM, Y. H.; PARK, J. W.; LEE, S. Y.; HYUN, C. K.; DO, M. S. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. **Experimental And Molecular Medicine**, v.38, p.599-605, 2006.

CLENDENING, L. Source Book of Medical History. New York: Dove Publications, pp. 14–18, 1942. In: GÜROKAK, S., KÜPELI, B. Consumption of Historical and Current Phytotherapeutic Agents for Urolithiasis: A Critical Review. **The Journal of Urology** Vol. 176, 450-455, August, 2006.

- CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas** v. 1, 483-484, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **Journal of Natural Products**. v.61, p.71-76, 1998.
- CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2005, 815 p.
- CRUNKHON, P.; MEACOCK, S. C. R. Mediators of the inflammation induced the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v.42, n.3, p.392-402, 1971.
- DANZ, H.; STOYANOVA, S.; THOMET, O. A. R.; SIMON, H. U.; DANNHARDT, G.; ULBRICH, H.; HAMBURGER, M. Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis. **Planta Medica**, v.68, p.875-880, 2002.
- DELFINO, V. D. A.; MOCELIN, A.B.J. Efeitos renais adversos dos anti-inflamatórios não hormonais: uma abordagem prática. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.17, n.4, p.199-205, 1995.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – a Biosynthetic Approach**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009, 550 p.
- DUMMER, C. D., THOMÉ, F. S., VERONESE, F. V. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 53(5): 446-450, 2007.
- ELISA, J.; DAISY, P.; IGNACIMUTHU, S.; DURAI PANDIYAN, V. Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koenex Retz.) Sm. in STZ - induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.182, p.67-72, 2009a.
- ELISA, J.; DAISY, P.; IGNACIMUTHU, S.; DURAI PANDIYAN, V. Normo-glycemic and hypolipidemic effects of costunolide isolated from *Costus speciosus* (Koenex Retz.) Sm. in streptozotocin – induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.179, p.329-334, 2009b.
- ELISA, J.; DAISY, P.; IGNACIMUTHU, S. Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex Retz) Sm. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, p.467-472, 2010.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, 1997.
- FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chemistry and Toxicology**., v.33, p.1061-1080, 1995.

- FOUNGBE, S.; KOUASSI, G.; KABLAN, J. B.; MARCY, R. Study of *Costus lucasianus*: plant juice, fraction combinations and pharmacologic estimation of natural product total activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Jul; 33(3): 221-226, 1991.
- GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. **Medicinal Research Reviews**, v.29, n. 5, p.767-820, 2009.
- GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1990, 1232 pp.
- GIREESH, G.; THOMAS, S. K.; JOSEPH, B.; PAULOSE, C. S. Antihyperglycemic and insulin secretory activity os *Costus pictus* leaf extract in streptozotocin induced diabetic rats and *in vitro* pancreatic islet culture. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.470-474, 2009.
- GÜROKAK, S., KÜPELI, B. Consumption of Historical and Current Phytotherapeutic Agents for Urolithiasis: A Critical Review. **The Journal of Urology**, v.176, p.450-455, 2006.
- HAZALIN, N. A. M. N.; RAMASAMY, K.; LIM, S. M.; WAHAB, J. A.; COLE, A. L. J.; MAJEED, A. B. A. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.9, p.46-51, 2009.
- HEGARTY, V. M.; MAY, H. M.; KHAW, K. T. Tea drinking and bone mineral density in older women. **American Journal Clin Nutr.**, v.71, p.1003–1007, 2000.
- HOOPER, A. M.; TSANUO, M. K.; CAMBERLAIN, K.; TITTICOMB, K.; SCHOLLES, J.; HASSANALI, A.; KHAN, Z. R.; PICHETT, J. A. Isoschaftoside, a C-glycosylflavonoid from *Desmodium uncinatum* root exudates, is an allelochemical against the development of *Striga*. **Phytochemistry**. v. 71, p. 904-908, 2010.
- ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirments for Registration of Pharmaceutical for Human Use – ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Text on Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2A (CPMP/ICH/381/94)*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1994.
- ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirments for Registration of Pharmaceutical for Human Use – ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.
- INOUE, K.; EBIZUKA, Y. Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. **FEBS Letters**, v.378, p.157 – 160, 1996.

- JOHNSTON, B.; BUTCHER, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. **Semin Immunol.**, v.14, p. 83-92, 2002.
- KALE, M.; MISAR, A. V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A. M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolata* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n.2, p.300-304, 2007.
- KALLINGS, L. O. The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/ AIDS. **Journal of Internal Medicine**, v.263, n.3, p. 218–243, 2008.
- KANG, B. K.; CHUNG, S. W.; KIM, T. S. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by hypericin, an active component of *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v.67, p.364-366, 2001.
- KELLER, A. C.; VANDEBROCK, I.; LIU, Y.; BALICK, M. J.; KRONENBERG, F.; KENNELLY, E. J.; BRILLANTES, A. M. B. *Costus spicatus* tea failed to improve diabetic progression in C57BLKS/J db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.248-254, 2009.
- KO, H. C.; WANG, Y. H.; LIOU, K. T.; CHEN, C. M.; CHEN, C. H.; WANG, W. Y.; CHANG, S.; HOU, Y. C.; CHEN, K. T.; CHEN, C. F.; SHEN, Y. C. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. **European Journal of Pharmacology**, v.555, p.211–217, 2007.
- KOO, T. H.; LEE, J. H.; PARK, Y. J.; HONG, Y. S.; KIM, H. S.; KIM, K. W.; LEE, J. J. A sesquiterpene lactone, costunolide, from *Magnolia grandiflora* inhibits NF- κ B by targeting I κ B phosphorylation. **Planta Medica**, v.67, p.103-107, 2001.
- KRAFCHYK, N.; KÖTKE, M.; LEHNERT, N.; GLOMB, M. A. Phenolic composition of rhubarb. **European food research technology**, v. 228, p. 187-196, 2008.
- KUBO, T., KAJIMOTO, T., NOHARA, T., HIRAYAMA, H., SHOKUNYU, O., IKEGAMI, K., IRINO, N., 1989. Extraction of flavonoids from *Desmodium styracifolium* for prevention of kidney stones. **Japanese patent Application: JP 88-132874 19880601**. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1989), CODEN: JKXXAF JP 01305080 A 19891208 Heisei, 6 pp. **In:** GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; SALIMENA-PIRES, F. R. Compounds from *Vitex polygama* active against kidney disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 320-322, 2008.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 1592, p. 2005.
- LANDOLFI, R.; MOWER, R. L., STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. **Biochemistry Pharmacology**, v.33, p.1525–1530, 1984.
- LEITE, J. P. V. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e variação sazonal e intra-específica de polifenóis totais em populações**

nativas. 2002. 299f. Tese (Doutorado em Ciências – Química), Depto Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LEV, E.; DOLEV, E.: Use of natural substances in the treatment of renal stones and other urinary disorders in the Medieval Levant. *Am J Nephrol*, **22**: 172, 2002 **In**: GÜROKAK, S., KÜPELI, B. Consumption of Historical and Current Phytotherapeutic Agents for Urolithiasis: A Critical Review. **The Journal of Urology** v. 176, 450-455, August 2006.

LIN, R. C.; HANQUET, B.; DUBOIS, M. A. L. Aferoside A, a steroidal saponin from *Costus afer*. **Phytochemistry** v.43, n.3, p. 665-668, 1996.

LIN, L.; CHEN, P.; HARNLY, J. M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 8130-8140, 2008.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. **Contribuição para padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonoides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante**. Belo Horizonte: 2005. 259f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MAAS, P.J.M. *Costoidae (Zingiberaceae)*. Flora Neotropica, Monograph nº 8. Hafner, New York. 1972.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R. & THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer – Verlag., 1970, 354 p.

MANJULA, N.; GAYATHRI, B.; VINAYKUMAR, K. S.; SHANKERNARAYANAN, N. P.; VISHWAKARMA, R. A.; BALAKRISHNAN, A. Inhibition of MAP kinases by crude extract and pure compound isolated from *Commiphora mukul* leads to down regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-2. **Int Immunopharmacol.**, v.6, p.122-132, 2006.

MEDEIROS, K. C. P.; MONTEIRO, J. C.; DINIZ, M.F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SILVA, B. A.; PIUVEZAM, M. R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p.23-28, 2007.

MOURA, M. D. **Papel do flavonoide diocleína no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E**. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

NEVES, P. L. **Inflamação na doença renal crônica**. 326 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

- NEWMAN, D.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products.**, v.70, p.461-477, 2007.
- NIJVELDT, R. J.; VANS NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition.** v.74, p.418-425, 2001.
- OBUTE, C. G.; ADUBOR, G. O. Chemicals Detected in Plants Used For Folk Medicine in South Eastern Nigeria. **Ethnobotanical Leaflets**, v.11, p.173-194, 2007.
- OSMAN, H. E., MAALEJ, N., SHANMUGANAYAGAM, D., FOLTS, J. D. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. **J Nutr.**, v.128, p.2307–2312, 1998.
- OWOLABI, O. I.; OMOGHAI, E. K.; FALODUN, A. Oxytocic effects of the aqueous leaf extract of *Costus lucasianus* – family Costaceae on isolated non-pregnant rat uterus. **Pak. Journal Pharmacology Science.**, v.23, n.2, p. 207-11, 2010.
- PAK, C. Y. C.: Citrate and renal calculi. *Miner Electrol Metab*, **13**: 257, 1987. In: GÜROKAK, S., KÜPELI, B. Consumption of Historical and Current Phytotherapeutic Agents for Urolithiasis: A Critical Review. **The Journal of Urology** v. 176, 450-455, August 2006.
- PAL, A.; ROY, A. Embryo culture of *Costus speciosus* (Koen) Sm. To regenerate variable diosgenin yielding clones. **Plant Cell Reports**, v.10, p. 565- 568, 1991.
- PAPAGIANNI A, KALOVOULOS M, KIRMIZIS D, VAINAS A, BELECHRI AM, ALEXOPOULOS E, Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant.** 18:113-119, 2003.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students for organic chemistry.** 3th edition. Washington: Brooks/Kole, 2001, 579p.
- POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenin-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n.2, p.331-338, 2004.
- QIAO, C. F.; LI, Q. W.; DONG, H.; XU, L. S.; WANG, Z. T. Studies on chemical constituents of two plants from *Costus*. **Zhonggriao Zhong Yao ZaZhi.**, v.27, n.2, 123-5, 2002.
- QIU, Y.; LIU, Q.; BETA, T. Antioxidant activity of commercial wild Rice and identification of flavonoids compounds in active fractions. **Journal of Agricultural Food and Chemistry.** v. 57, p. 7543-7551, 2009.

- QUITANS JUNIOR, L. J.; SANTANA, M. T.; MELO, M. S.; DE SOUZA, D. P.; SANTOS, I. S.; SIQUEIRA, R. S.; LIMA, T. C.; SILVEIRA, G. O.; ANTONIOLLI, A. R.; RIBEIRO, L. A.; SANTOS, M. R. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.10; 1097-1102, 2010.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**, 6^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p.848.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. and PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, No. 7, 933-956, 1996.
- ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine** 340(2):115-26, 1999.
- ROY, A.; PAL, A. Propagation of *Costus speciosus* (Koen) Sm. Trough *in vitro* rhizome production. **Plant Cell Reports**, v.10, p. 525-528, 1991.
- RUSAK, G.; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 43, p. 121-125, 1993.
- SALEEM, M.; KIM, H. J.; ALI, M. S.; LEE, Y. S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Products Rep.**, v.22, p.696–716, 2005.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3^a edição, Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, 264 p.
- SCHRIER, R. W. **Manual de Nefrologia – Diagnóstico e tratamento**. 3 ed. Editora MEDSI, Rio de Janeiro, RJ, 1993.
- SHEN, C. C.; WANG, Y. H.; CHANG T, T.; LIN, L. C.; DON, M. J.; HOU, Y. C.; LIO, K. T.; CHANG, S.; WANG, W. Y.; KO, H. C.; SHEN, Y. C. Anti-inflammatory ergostanes from the basidiomata of *Antrodia salmonea*. **Planta Medica**, v.73, p.1208–1213, 2007.
- SHETTY, A. J.; CHOUDHURY, D.; REJEESH, H.; NAIR, V.; KURUVILLA, M.; KOTIAN, S. Effect of the insulin plant (*Costus igneus*) leaves on dexamethasone – induced hyperglycemia. **Int. J. Ayurveda Res.**, v.1, n.2, p.100-102, 2010.
- SHIE, J. J.; CHEN, C. A.; LIN, C. C. KU, A. F. CHENG, T. J. R.; FANG, J. M.; WONG, C. H. Regioselective synthesis of di-C-glycosylflavones possessing anti-inflammation activities. **Organic & Biomolacular Chemistry**. v.8, p. 4451-4462, 2010.
- SHILPA, K.; SANGEETHA, K. N.; MUTHUSAMY, V. S.; SUJATHA, S.; LAKSHMI, B. S. Probing key targets in insulin signaling and adipogenesis using a methanolic

- extract of *Costus pictus* and its bioactive molecule, methyltetracosanoate. **Biotechnol. Lett.**, v.31, p.1837-1841, 2009.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **J Invest Dermatol.**, v.102, n.1, p.122-124, 1994.
- SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. A furostanolglycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v.51, p.931-935, 1999a.
- SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. A new steroidal saponin from the rhizomes of *Costus spicatus*. **Planta Medica**, v.65, n.3, p.285 – 7, 1999b.
- SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v.53, p.87 – 92, 2000.
- SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.239-242, 2003.
- SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus spiralis*. **Zeitschrift Fur Naturforschung** v.59c, p.81-85, 2004.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Ed. Livros Técnicos e Científicos, 2005, 490p.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 5ª ed., Santa Catarina: Editora da UFSC, 2004, p. 821.
- SIMOES, L. R. **Fitoquímica, atividade antiviral e antioxidante de *Distictella elongata* Vahl (Bignoniaceae)** 152f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2010.
- SOUZA, A. M.; LARA, L. S.; PREVIATO, J. O.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C.; DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Modulation of sodium pumps by steroidal saponins. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal Of Biosciences**, v.59, n.5-6, 432-436, 2004.
- SPECHT, C. D. Systematics and evolution of the tropical monocot family Costaceae (Zingiberales): a multipledataset approach. **Systematic Botany**, v.31, p. 88-105, 2006.
- SU, B. N.; CUENDET, M.; FARNSWORTH, N. R.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Activity-guided fractionation of the seeds of *Ziziphus jujuba* using a cyclooxygenase-2 inhibitor assay. **Planta Medica**, v.68, p.1125-1128, 2002.
- SUKSAMRARN, A.; KUMPUN, S.; KIRTIKARA, K.; YINGYONGNARONGKUL, B.; SUKSAMRARN, S. Iridoids with antiinflammatory activity from *Vitex peduncularis*. **Planta Medica**, v.68, p.72-73, 2002.

- TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.71, n.6, p.1387-1404, 2007.
- TAIWO, A. O.; BOLANLE, A. A. The leaf essential oil of *Costus afer* Ker – Grawl. **Flavour and Fragrances Journal**, v.18, p.309 – 311, 2003.
- TEWARY, P. V.; CHATURVEDI, C.; PANDEY, V. B. Antifertility activity of *Costus speciosus* Sm. **Indian Journal of Pharmacology**, v.35, p.114-115, 1973. In: FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Journal of Nutrition**, v.88, p.587-605, 2002.
- TOMLINSON, P. B. 1962. Phylogeny of the Scitamineae-morphological and anatomical considerations. **Evolution**, v.16, p.192–213, 1962. In SPECHT, C. D.; STEVENSON, D. W. M. A new phylogeny-based generic classification of Costaceae (Zingiberales). **Taxon**, v.55, n.1, p.153-163, 2006.
- TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; VASSILIKI, O. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS **Molecules**. v.12, p.593-606, 2007.
- TUCHINDA, P.; REUTRAKUL, V.; CLAESON, P.; PONGPRAYOON, U.; SEMATONG, T.; SANTISUK, T.; TAYLOR, W. C. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. **Phytochemistry**. 59:169–173, 2002.
- UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. Luteolin as an Anti-inflammatory and Anti-allergic Constituent of *Perillafrutescens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** v.25, n.9, p. 1197-1202, 2002.
- UDEM, S. C.; EZEASOR, C. K. The acute and subchronic toxicity studies of aqueous leaf and stem bark extract of *Costus afer* Ker (Zingiberaceae) in mice. **Comp. Clin, Pathol.**, v.19, p.75-80, 2010.
- VIEL, T. A.; DOMINGOS, C. D.; MONTEIRO, A. P. S.; LANDMAN, M. T. R. L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.193-198, 1999.
- VIJAYALAKSHMI, M. A.; SARADA, N. C. Screening of *Costus speciosus* extracts for antioxidant activity. **Fitoterapia**, v.79; p.197-198, 2008.
- VINEGAR, R.; W. SHREIBER & R. HOGO. Biphasic development of carrageenin edema in rats **J.Pharm acol. Exp.** 166: 96-103, 1969.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg: New York Tokyo, 1984.

WANG, Y.; FANG, Y.; HUANG, W.; ZHOU, X.; WANG, M.; ZHONG, B.; PENG, D. Effect of sinomenine on cytokine expression of macrophages and synoviocytes in adjuvant arthritis rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.37–43, 2005.

WASSERSTEIN, A. G.: Nephrolithiasis: acute management and prevention. *Dis Mon*, 44:196, 1998 **In**: Gürokak, S., Küpeli, B. Consumption of Historical and Current Phytotherapeutic Agents for Urolithiasis: A Critical Review. **The Journal of Urology** Vol. 176, 450-455, August 2006.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. The leaf flavonoids of the Zingiberales. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.5, n.3, p.221-229, 1977.

XAGORARI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T.; ROUSSOS, C. Luteolin Inhibits an Endotoxin-Stimulated Phosphorylation Cascade and Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.296, n.1, p.181-187, 2001.

XIE, C.; VEITCH, N. C.; HOUGHTON, P. J.; SIMMONDS, M. S. J. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 1204 – 1207, 2003.

ZAPOROZHETS, O. A.; KRUSHINSKSYA, E. A.; BARVINCHENKO, V. N.; LIPKOVSKAYA, N. A.; POGORELYI, V. K. Spectrophotometric determination of hydroxycinnamic acid and related compounds in *Echinaceae* preparations. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 37, n. 12, p. 632-636, 2003.

APÊNDICE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 193/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Fitoquímica e atividade anti-inflamatória de *Costus Spiralis (Jacq) Roscoe (Cana do brejo)***", que tem como responsável(is) **Márcio de Matos Coelho**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 12/2010**.


Este certificado expira-se em **1/ 12/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 193/2010**, related to the project entitled "**Phytochemistry and anti inflammatory activity of *Costus Spiralis (Jacq) Roscoe (Cana do brejo)***", under the supervisors of **Márcio de Matos Coelho**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 1, 2010**.

This certificate expires in **December 1, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Dezembro de 2010.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)